

Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisa René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MOSQUITOS**  
*Aedes fluviatilis* **TRANSGÊNICOS PARA O BLOQUEIO DA MALÁRIA**  
**AVIÁRIA**

**FLÁVIA GUIMARÃES RODRIGUES**

Belo Horizonte – MG

Março de 2007

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisa René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**“OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MOSQUITOS  
*Aedes fluviatilis* TRANSGÊNICOS PARA O BLOQUEIO DA MALÁRIA  
AVIÁRIA”**

por

**FLÁVIA GUIMARÃES RODRIGUES**

Tese apresentada com vistas  
à obtenção do Título de  
Doutor em Ciências na área  
de concentração Biologia  
Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Luciano Andrade Moreira  
Co-orientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Belo Horizonte – MG

Março de 2007

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R696o      Rodrigues, Flávia Guimarães.  
2007

Obtenção e caracterização molecular de mosquitos *Aedes fluviatilis* transgênicos para o bloqueio da malária aviária / Flávia Guimarães Rodrigues. – Belo Horizonte, 2007.

xxi, 174 f: il.; 210 x 297 mm.

Bibliografia: f. 156 - 174

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Mosquito transgênico 2. Malária aviária 3. PLA<sub>2</sub>m  
I. Título. II. Moreira, Luciano Andrade (Orientação) III. Brito, Cristiana, Ferreira Alves.

CDD – 22. ed. – 616.936 2

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisa René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**“OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MOSQUITOS  
*Aedes fluviatilis* TRANSGÊNICOS PARA O BLOQUEIO DA MALÁRIA  
AVIÁRIA”**

por

**Flávia Guimarães Rodrigues**

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira (Presidente)

Prof. Dr. Alexandre A. Peixoto

Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

Prof. Dr. Marcos Horácio Pereira

Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Suplente: Prof. Dr. Guilherme Corrêa Oliveira

Tese defendida e aprovada em 29 de março de 2007.

*À memória de Erodites Menezes, minha avó.*

*A Saulo e Almeici, meus pais.*

*A Vladimir, meu noivo.*

*“É preciso recordar sempre que por detrás de cada tabela, de cada relatório, ou de cada material de exame, existe vida, existe gente, existe sofrimento, à espera do nosso esforço e de nossa solidariedade”.*

*Carlyle Macedo  
Diretor da OPAS*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida. Por estar sempre presente guiando e iluminando meus caminhos.

A meus pais, Saulo e Almecei, os mais profundos agradecimentos por suas sábias lições de esperança; sempre repetindo palavras essenciais – como, por exemplo, amor, crença, compreensão, determinação, respeito – infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

Aos meus irmãos Saulo Júnior e Leila, pelo companheirismo, carinho, amor e amizade eternos.

Aos meus queridos avós maternos, Erodites e Aristides (saudosos), e paternos, Salino e Terezinha pelos conselhos, pela transferência de experiências de vida, pelas palavras de carinho, e por sempre torcerem por mim.

A meu noivo, Vladimir, por sua extensa paciência, pelo seu amor, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo seu apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios.

À D. Marília e S. Sílvio por terem praticamente me adotado como filha, aqui em BH, e sempre estarem me apoiando nos momentos difíceis e compartilhando os momentos de alegria.

Agradeço ao Dr. Luciano Andrade Moreira, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela orientação e principalmente pelo convívio nestes quatro anos de trabalho. Sou inteiramente grata pelos ensinamentos que ultrapassam a tese, bem como o imenso carinho nos momentos de dificuldade. Agradeço pelo incentivo, pela presença marcante, e pelo exemplo de profissionalismo. Com ele tive a oportunidade de enriquecer meu conhecimento, com suas argumentações científicas e sugestões que contribuíram pelo meu crescimento profissional e pessoal.

A minha co-orientadora, Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, por sua disponibilidade, ensinamentos e apoio, fundamentais durante o processo de criação e elaboração desta tese. Ressalto aqui meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Marcelo-Jacobs-Lorena por ter me recebido em seu laboratório no Departamento de Microbiologia Molecular e Imunologia, da Escola de Saúde Pública do

---

Instituto de Pesquisas em Malária da Johns Hopkins University, USA, e ter colaborado para o desenvolvimento deste trabalho.

À Cristina Moreira, Mauro Marrelli, Nancy, “amigos da Johns Hopkins”, sempre lembrarei de vocês com muito carinho. Agradeço o apoio, incentivo e amizade.

Um agradecimento especial ao Geraldo Felício de Carvalho, o “Geraldinho”, pela imensa ajuda na manutenção e implantação das colônias de mosquitos, pela companhia nas inúmeras idas ao mercado Central para a aquisição dos mais variados materiais para o insetário, pelas palavras de incentivo em momentos difíceis, pela amizade, pelo exemplo de ser humano, sempre serei muito grata.

A Dra. Luzia Carvalho, pelas ótimas discussões nos seminários às quartas-feiras, que foram muito valiosas e pertinentes e, pelo exemplo de dedicação à pesquisa envolvendo a malária.

A Dra. Antoniana, pelas valiosas conversas e sugestões sobre a malária aviária, pelos ensinamentos nas aulas de Malária e antimaláricos na UFMG, que despertaram em mim um interesse ainda maior em trabalhar nesta área.

A Dra. Ana Paula Madureira pelo auxílio nos testes estatísticos e pela amizade.

Agradeço aos participantes da banca examinadora por terem aceitado meu convite, e pela contribuição na melhoria deste trabalho.

Aos meus co-orientandos, Sabrina, Bruno e Paloma, com os quais creio que contribuí com sua iniciação científica e que hoje são meus orgulhos. Agradeço pelo convívio, pela amizade, estejam certos de que também aprendi muito com vocês ao longo deste período, foi uma experiência bastante enriquecedora em minha vida pessoal e profissional.

Aos técnicos, Thiago e Walison, que me auxiliaram no último ano deste trabalho na manutenção do insetário, e que hoje são capazes de conduzi-lo de forma responsável e eficiente.

Aos meus amigos Fernando, Isabela Cerávolo, Taís, Bruno, Armando e Maíra por todos os momentos divertidos que passamos juntos, pelos conselhos, por compartilhar os momentos de questionamentos e pela amizade.

Aos demais colegas do Laboratório de Malária, Alice, Marcelle, Antônio, Júnia, Flávia Alessandra, Thiago Mourão, Fernanda, Isabela Oliveira, Cristiane pela alegre convivência, e pelo carinho.

À Marialice, pelos conselhos, pelas palavras de incentivo, por estar sempre disposta a ajudar, agradeço de coração.

À Tatiana, Rafael, a Dra. Cristina e ao Dr. Paulo Pimenta do Laboratório de Entomologia pelo imenso auxílio nos experimentos envolvendo a microscopia confocal.

A Dra. Silvane, e as estudantes Fernanda Barbosa e Fernanda Freire do Laboratório de Parasitologia, pela ajuda quando necessária nos experimentos com material radioativo.

Ao Jacy, Dona Vera, Marcílio, “amigos do biotério”, pelo auxílio com os animais e pela amizade.

Agradeço à Fernanda Barbosa, pela ótima convivência em casa, pela amizade, pelas conversas, pelas risadas, pelos momentos de descontração, pelo apoio e pelo companheirismo.

Agradeço a todos os colegas do Centro de Pesquisa René Rachou, estudantes, funcionários o pessoal da limpeza, aos motoristas e secretárias.

A ex-coordenadora do Curso de Pós-graduação, Dra. Virginia Shall pelas palavras de incentivo ao longo do curso.

Ao ex-diretor do Centro de Pesquisa René Rachou, Dr. Roberto Sena Rocha, que mesmo diante da falta de espaço na instituição nos forneceu uma sala para a manutenção dos mosquitos, agradeço imensamente a contribuição.

Ao Dr. Álvaro José Romanha, atual diretor do CPqRR pelo auxílio na ampliação de nosso insetário e pelo fornecimento de recursos financeiros quando necessários.

Ao CNPq, TDR/WHO, CPqRR/FIOCRUZ pelo financiamento deste projeto.

Enfim... agradeço a todos que colaboraram direto ou indiretamente para a conquista de mais esta vitória em minha vida!

OBRIGADA!!!!!!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XX</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XXI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1. Situação epidemiologia da Malária.....	01
1.2. Os parasitas da malária e o ciclo biológico dos plasmódios.....	02
1.2.1. Ciclo do parasita no hospedeiro vertebrado.....	03
1.2.2. Ciclo do parasita no hospedeiro invertebrado.....	04
1.3. Mosquitos transmissores de Malária .....	07
1.3.1. Humana.....	07
1.3.2. Aviária.....	09
1.4. Fisiologia da digestão em mosquitos e interação com o plasmódio.....	10
1.4.1 Matriz peritrófica e enzimas digestivas.....	10
1.4.2. Invasão do epitélio intestinal pelo plasmódio.....	13
1.5. Controle de mosquitos transmissores de doenças.....	14
1.6. A engenharia genética como estratégia de controle de parasitas.....	15
1.6.1. Insetos vetores transgênicos como estratégia de controle de parasitos....	16
1.6.1.1. Uso de transposons para transformação de insetos.....	16
1.6.1.2. Uso de genes marcadores e seus promotores para transformação.....	19
1.6.1.3 Caracterização de promotores para direcionar a expressão do gene de bloqueio.....	21
1.6.1.4. Genes de bloqueio ao parasita.....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>28</b>
3.1. Objetivos específicos.....	28

<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>29</b>
4.1. Colônias de mosquitos.....	29
4.2. Animais.....	29
4.3. Parasitas.....	29
4.4. Infecção direta de mosquitos.....	30
4.5. Infecção artificial de mosquitos.....	30
4.6. Plasmídeos e reagentes.....	31
<b>4.7. Atividade antiparasítica da gomesina.....</b>	<b>31</b>
4.7.1. Manutenção do cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	31
4.7.2. Gomesina e Artesunato.....	32
4.7.3. Atividade in vitro da gomesina contra as formas eritrocíticas de <i>P. falciparum</i> .....	32
4.7.4. Atividade in vitro da gomesina contra oocinetos de <i>P. berghei</i> .....	32
4.7.5. Atividade da gomesina sobre oocistos de <i>P. falciparum</i> .....	33
<b>4.8. Expressão da proteína PLA<sub>2</sub>m recombinante e produção de anticorpos policlonais.....</b>	<b>33</b>
4.8.1. Digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição.....	33
4.8.2. Produção de células de <i>E. coli</i> competentes.....	33
4.8.3. Transformação de células competentes.....	34
4.8.4. Purificação do DNA plasmidial.....	35
4.8.5. Expressão da proteína recombinante.....	35
4.8.6. Processamento de bactérias após indução com IPTG.....	36
4.8.7. Preparação do lisado desnaturado de bactérias.....	36
4.8.8. Purificação em cromatografia de afinidade.....	37
4.8.9. Dosagem de proteínas.....	37
4.8.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	37
4.8.11. Geração de anticorpos policlonais mono-específicos.....	38
4.8.12. Ensaio de ELISA.....	39
4.8.13. Imunoblotting.....	39
<b>4.9. Construção do gene híbrido para obtenção de mosquitos transgênicos.....</b>	<b>40</b>
4.9.1. Digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição.....	40
4.9.2. Defosforilação dos vetores de clonagem.....	41
4.9.3. Purificação dos fragmentos de DNA.....	41

4.9.4. Ligação dos fragmentos de DNA em vetores de clonagem.....	41
4.9.5. Reação em cadeia da polimerase.....	41
4.9.6. Eletroforese em gel de agarose.....	43
4.9.7. Dosagem de ácidos nucleicos.....	43
4.9.8. Sequenciamento de nucleotídeos.....	43
<b>4.10. Produção e caracterização das linhagens de mosquitos transgênicos.....</b>	<b>44</b>
4.10.1. Microinjeção em embriões.....	44
4.10.2. Extração de DNA genômico.....	47
4.10.3. <i>Southern Blot</i> .....	47
4.10.4. Preparação e hibridização das sondas radioativas.....	48
4.10.5. Extração de RNA total.....	48
4.10.6. Análise de expressão por meio de RT-PCR.....	49
4.10.7. Ensaio de inibição da formação de oocistos.....	50
4.10.8. Microscopia confocal.....	50
<b>4.11. Análise Estatística.....</b>	<b>51</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1. Efeito do peptídeo antimicrobiano gomesina sobre espécies de <i>Plasmodium</i>.....</b>	<b>52</b>
5.1.1. Efeito da gomesina sobre os estágios assexuados de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	52
5.1.2. Efeito da gomesina sobre o desenvolvimento de oocinetos de <i>P. berghei</i> .....	53
5.1.3. Efeito da gomesina sobre o estágio sexuado de <i>P. falciparum</i> .....	54
<b>5.2. Expressão da proteína PLA<sub>2</sub>m recombinante e produção de anticorpos policlonais.....</b>	<b>54</b>
5.2.1. Montagem do gene da PLA <sub>2</sub> m no vetor pET32a.....	54
5.2.2. Clonagem do vetor pET32a contendo o gene da PLA <sub>2</sub> m em bactérias.....	55
5.2.3. Sequenciamento de vetor pET32a contendo o gene da PLA <sub>2</sub> m.....	58
5.2.4. Expressão da proteína recombinante PLA <sub>2</sub> m.....	60
5.2.4.1. Localização da PLA <sub>2</sub> m em corpúsculos de inclusão.....	63
5.2.4.2. Purificação da proteína PLA <sub>2</sub> m em coluna de Níquel.....	64
5.2.5. Atividade da proteína PLA <sub>2</sub> m recombinante sobre o desenvolvimento de <i>P. gallinaceum</i> .....	66

5.2.6. Produção de anticorpos policlonais contra PLA <sub>2</sub> m.....	67
5.2.7. Reconhecimento da PLA <sub>2</sub> m pelos anticorpos policlonais.....	68
<b>5.3. Montagem do gene híbrido AgPerPLA<sub>2</sub>m no vetor <i>piggyBacEGFP</i>.....</b>	<b>70</b>
5.3.1. Subclonagem da PLA <sub>2</sub> m em pGem-T easy.....	73
5.3.2. Digestão dos plasmídeos pGem-T e pUC19.....	74
5.3.3. Inserção da PLA <sub>2</sub> m no plasmídeo pUC19.....	75
5.3.4. Mapa de restrição do plasmídeo pUC19 contendo o cassete.....	76
5.3.5. Sequenciamento de clones AgPer1PLA <sub>2</sub> m/pUC19.....	78
5.3.6. Transferência do cassete AgPer1PLA <sub>2</sub> m para o plasmídeo <i>shuttle</i> .....	80
5.3.7. Clonagem do gene híbrido AgPer1PLA <sub>2</sub> m em <i>piggyBac</i> .....	82
5.3.8. Mapa de Restrição do vetor <i>piggyBac/AgPer1PLA<sub>2</sub>m</i> .....	83
5.3.9. Sequenciamento do clone AgPer1PLA <sub>2</sub> m/ <i>piggyBac</i> .....	84
5.3.10. Transformação de mosquitos <i>Ae. fluviatilis</i> com o transposon <i>piggyBac</i> .....	86
5.3.11. Visualização do gene marcador em microscópio de fluorescência.....	87
5.3.12. Amplificação do gene marcador e do gene de bloqueio.....	89
5.3.13. Integração do gene da PLA <sub>2</sub> m no genoma dos mosquitos transgênicos.....	90
5.3.14. Localização da expressão do RNA mensageiro da PLA <sub>2</sub> m.....	92
5.3.15. Cinética da expressão do RNAm da PLA <sub>2</sub> m em mosquitos transgênicos.....	94
5.3.16. Cinética da expressão do RNAm da PLA <sub>2</sub> m da família 4T.....	95
5.3.17. Localização da proteína PLA <sub>2</sub> m por microscopia confocal.....	97
5.3.18. Inibição do desenvolvimento de <i>P. gallinaceum</i> em mosquitos transgênicos.....	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> .....	06
Figura 2: Modelo proposto para a participação da AgPer1 e de AgChit na formação e manutenção da estrutura da MP.....	11
Figura 3: Comparação da seqüência de aminoácidos da fosfolipase A <sub>2</sub> do veneno de abelha original (PLA <sub>2</sub> ) com a forma mutada (PLA <sub>2</sub> m).....	26
Figura 4. Metodologia para a obtenção de mosquitos <i>Aedes fluviatilis</i> transgênicos.....	46
Figura 5. Curva dose-resposta da viabilidade de parasitas na presença da gomesina e artesunato contra a cultura in vitro das cepas W2 e 3D7-GFP de <i>P. falciparum</i> .....	52
Figura 6. Digestão dos vetores pET32a e pGemT com as enzimas <i>Kpn</i> I e <i>Bam</i> HI.....	55
Figura 7. PCR de colônias de bactérias para verificar a inserção do gene da PLA <sub>2</sub> m no vetor de expressão pET32a.....	56
Figura 8. Mapa de restrição do vetor pET32a contendo o gene da PLA <sub>2</sub> m.....	57
Figura 9. Alinhamento da seqüência do gene da PLA <sub>2</sub> m no vetor pET32a.....	59
Figura 10. PCR de colônias de bactérias para verificar inserção do gene da PLA <sub>2</sub> m no vetor de expressão pET32a em bactérias BL21 <i>pLys</i> S.....	61
Figura 11. Análise em SDS-PAGE a 12% da cinética de expressão da proteína recombinante PLA <sub>2</sub> m.....	62
Figura 12. Análise em SDS-PAGE a 12% para localizar a expressão da PLA <sub>2</sub> m.....	63
Figura 13. Análise em SDS-PAGE a 12% das frações obtidas da purificação da proteína recombinante PLA <sub>2</sub> m.....	65
Figura 14. Titulação dos soros policlonais contra PLA <sub>2</sub> m.....	68
Figura 15. Análise em imunoblotting do reconhecimento do anticorpo policlonal mono-específico contra PLA <sub>2</sub> m.....	69
Figura 16. Esquema mostrando a 2ª etapa até a obtenção do plasmídeo <i>piggyBac</i> EGFP contendo o cassete AgPer1PLA <sub>2</sub> m para ser utilizado na microinjeção de embriões de <i>Ae. fluviatilis</i> .....	71
Figura 17: Esquema mostrando a obtenção do plasmídeo pUC19, contendo o cassete AgPer1PLA <sub>2</sub> m.....	72

Figura 18. PCR de colônias para verificar a clonagem do gene da PLA <sub>2</sub> m em pGem-T easy.....	74
Figura 19. Digestão de dois clones de bactérias transformadas com o gene da PLA <sub>2</sub> m em pGem-T easy com as enzimas <i>Kpn</i> I e <i>Bam</i> H I.....	74
Figura 20. Digestão do plasmídeo pUC19 com as enzimas <i>Kpn</i> I e <i>Bam</i> H I.....	75
Figura 21. Amplificação através da PCR do gene da PLA <sub>2</sub> m ligado ao promotor AgPer1 no plasmídeo pUC19.....	76
Figura 22. Mapa de restrição dos clones de bactérias transformadas com o gene AgPerPLA <sub>2</sub> m em pUC19.....	77
Figura 23. Alinhamento da seqüência da PLA <sub>2</sub> m em pUC19.....	79
Figura 24. Plasmídeo <i>shuttle</i> digerido com a enzima <i>Pst</i> I.....	81
Figura 25. Digestão dos plasmídeos <i>shuttle</i> e <i>piggyBac</i> com as enzimas <i>Asc</i> I e <i>Fse</i> I.....	82
Figura 26. Digestão do DNA de diferentes clones de bactérias transformadas com o vetor <i>piggyBac</i> contendo o gene AgPer1PLA <sub>2</sub> m com as enzimas <i>Asc</i> I e <i>Fse</i> I.....	83
Figura 27. Alinhamento do resultado do sequenciamento do gene da proteína PLA <sub>2</sub> m no <i>piggyBac</i> .....	85
Figura 28. Diagrama esquemático da construção pBac[3xP3-EGFPam]-AgPer1-PLA <sub>2</sub> m que utilizada para transformação de <i>Ae. fluviatilis</i> .....	86
Figura 29. Fotomicrografia de fluorescência para verificar a presença da expressão do gene marcador (EGFP).....	88
Figura 30. Amplificação através da PCR do gene marcador e do gene da PLA <sub>2</sub> m em amostras de DNA genômico extraídas de larvas selvagens e transgênicas de <i>Ae. fluviatilis</i> .....	89
Figura 31. Integração do gene híbrido no genoma de mosquitos <i>Ae. fluviatilis</i> transgênicos.....	91
Figura 32. Expressão do RNA mensageiro da PLA <sub>2</sub> m nas linhagens transgênicas de <i>Ae. fluviatilis</i> .....	93
Figura 33. Cinética da expressão do RNA mensageiro da PLA <sub>2</sub> m nas linhagens transgênicas de <i>Ae. fluviatilis</i> .....	94
Figura 34. Cinética da expressão do RNA mensageiro da PLA <sub>2</sub> m na família 4T.....	96

Figura 35. Marcação por imunofluorescência do intestino de mosquitos selvagens e transgênicos (4T) com anticorpos contra PLA <sub>2</sub> e PLA <sub>2</sub> m.....	98
Figura 36. Marcação por imunofluorescência do intestino de mosquitos selvagens e transgênicos (8T) com anticorpos contra PLA <sub>2</sub> m.....	99
Figura 37. Marcação por imunofluorescência do intestinos de mosquitos selvagens e transgênicos (10T) com anticorpos PLA <sub>2</sub> m.....	100

---

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1: Iniciadores utilizados nas reações da PCR.....	42
TABELA 2: Efeito da PLA <sub>2</sub> m recombinante sobre a formação de oocistos de <i>P. gallinaceum</i> .....	53
TABELA 3: Inibição da formação de oocistos de <i>P. falciparum</i> por gomesina.....	54
TABELA 4: Tabela 4: Efeito da PLA <sub>2</sub> m recombinante sobre a formação de oocistos de <i>P. gallinaceum</i> .....	67
TABELA 5: Número de embriões injetados, sobrevivência dos adultos, número de famílias transgênicas e a frequência de transformação em mosquitos <i>Aedes fluviatilis</i> .....	87
TABELA 6: Efeito da expressão da PLA <sub>2</sub> m sobre a formação de oocistos de <i>P. gallinaceum</i> .....	102

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

- A – Alanina
- AeCP – Promotor da carboxipeptidase de *Aedes aegypti*
- AgCP – Promotor da carboxipeptidase de *Anopheles gambiae*
- AgPer1 – Região promotora da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae*
- BSA – Albumina bovina sérica
- cDNA – DNA complementar
- CIAP – Fosfatase alcalina intestinal bovina
- CSP – Proteína circumsporozoíta
- DAB – Diaminobenzidina
- DAPI – 4',6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato
- DDT – Dicloro-Difenil-Tricloroetano
- DEPC - Dietilpirocarbonato
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatos
- DP – Desvio padrão
- DTT – Ditioneitol
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- EEF – Formas exoeritrocíticas do plasmódio
- EGFP – Enhanced green protein fluorescent (proteína verde fluorescente melhorada)
- ELISA – Ensaio enzimático ligado à enzima
- Exp – Experimento
- GFP – Proteína verde fluorescente
- H – Histidina
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio
- HSP – proteína de choque térmico
- IPTG – isopropil-b-D-tiogalactopiranosídeo
- Kb – Kilobases
- kDa – Kilodaltons
- LB – Meio Luria-Bertani
- M – Molar

- 
- mg – Miligrama
  - ml – Mililitro
  - mM – Milimolar
  - MM – Marcador de massa molecular
  - MP – Matriz peritrófica
  - MS – Ministério da Saúde
  - N – Asparagina
  - NEB – New England Biolabs
  - Ni<sup>2+</sup>-NTA – Resina de ácido nitrilotriacético com níquel
  - NOS – Óxido nítrico sintetase
  - OD – Densidade ótica
  - OMS – Organização Mundial de Saúde
  - pb – Pares de base
  - PBS – salina tamponada com fosfato
  - PCR – Reação em cadeia da polimerase
  - *piggyBac* – Vetor de clonagem pBac[3xP3(EGFPam)]
  - PLA<sub>2</sub> – Proteína Fosfolipase A<sub>2</sub>
  - PLA<sub>2</sub>m – Proteína Fosfolipase A2 mutada
  - pmoles – Picomoles
  - RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro
  - RP49 – gene constitutivo que codifica a proteína ribossomal rp49 de mosquitos
  - RT – Transcriptase reversa
  - RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase conjugada com a transcriptase reversa
  - SDS – Duodecil sulfato de sódio
  - SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
  - *Shuttle* – Plasmídeo de clonagem psLfa1180fa
  - SSC – Tampão citrato de sódio
  - T – Treonina
  - TAE – Tampão Tris-acetato EDTA, pH 8,0
  - TEMED – N, N, N', N' – tetrametil-etilenodiamina
  - UTR – Untranslated region (região não traduzida)

- V – Volts
- XA – Ácido xanturênico
- X g – Gravidade
- $\mu\text{g}$  – Micrograma
- $\mu\text{l}$  – Microlitro
- $\mu\text{mol/l}$  – Micromoles por litro

## RESUMO

A manipulação genética de mosquitos possibilita a inserção de moléculas efetoras que podem inibir o desenvolvimento de espécies de *Plasmodium*. O presente trabalho teve como objetivo estudar duas moléculas antiparasíticas [gomesina e fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2m</sub>)] como candidatas à expressão em mosquitos. O peptídeo antimicrobiano gomesina da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, foi capaz de inibir o desenvolvimento das formas sanguíneas das cepas W2 e 3D7-GFP de *P. falciparum*, com valores de IC<sub>50</sub> de 75,8 e 86,6µM, respectivamente. Além disso, mostramos que esta molécula na concentração foi capaz de reduzir em até 100% o desenvolvimento de oocinetos de *P. berghei* (a 50µM) e oocistos de *P. falciparum* (a 100µM). Anteriormente, experimentos in vitro, mostraram que a enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) isolada do veneno de abelha apresentou ação inibitória sobre o desenvolvimento de *P. falciparum* e *P. gallinaceum*, mas apresentou efeitos deletérios em mosquitos transgênicos, quando na sua forma ativa. Neste trabalho, expressamos em bactérias e purificamos uma forma mutante da proteína (PLA<sub>2m</sub>). Na concentração de 0,1µmol/l a proteína recombinante foi capaz de reduzir em até 79% o número de oocistos de *P. gallinaceum* em mosquitos *Aedes fluviatilis*, quando adicionada ao sangue de aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*) infectadas. Para a geração de mosquitos transgênicos utilizamos o promotor da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae* (AgPer1) para dirigir a expressão do gene da PLA<sub>2m</sub>. A construção do gene híbrido (AgPer1/PLA<sub>2m</sub>) foi inserida no elemento de transposição *piggyBac*, que contém como marcador, o gene da proteína verde fluorescente melhorada (EGFP). Pela microinjeção de 770 embriões, foram formadas 15 famílias e, após a seleção de cerca de 22.000 larvas foram obtidas quatro linhagens transgênicas, representando uma eficiência na transformação de 27%. A expressão do EGFP foi observada no tubo neural e olhos de larva, pupa e adulto. Utilizando iniciadores específicos, confirmamos, pela PCR, a presença dos genes EGFP (700pb) e PLA<sub>2m</sub> (500bp). A produção do RNAm da PLA<sub>2m</sub> foi específica no intestino de fêmeas, não variando após a alimentação sanguínea. Por microscopia confocal detectamos a presença da proteína PLA<sub>2m</sub> no intestino dos mosquitos transgênicos. Além disso, ensaios de bloqueio ao parasita mostraram redução significativa do desenvolvimento de oocistos de *P. gallinaceum*, de 17,5 a 68,5%, nas quatro linhagens transgênicas. Este estudo mostra a importância de moléculas efetoras e da geração de mosquitos transgênicos como estratégia alternativa de controle da malária, bem como, uma ferramenta para estudos de interação parasita/ vetor invertebrado.

---

## ABSTRACT

The genetic manipulation of mosquitoes allows the insertion of effector molecules to block the development of *Plasmodium* spp. This work aimed to study two antiparasitic molecules [gomesin and phospholipase A<sub>2</sub> (mPLA<sub>2</sub>)] as candidates for expression in transgenic mosquitoes. Gomesin, an antimicrobial peptide from the *Acanthoscurria gomesiana* spider, was able to inhibit the growth of intraerythrocytic stages of both W2 and 3D7-GFP *P. falciparum* strains, at IC<sub>50</sub> of 75.8 and 86.6 μM, respectively. Furthermore, we showed that this molecule was able to reduce up to 100% the development of *P. berghei* ookinetes (at 50 μM) and *P. falciparum* oocysts (at 100 μM). Previously, in vitro experiments have shown that the bee venom phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) inhibits both *P. falciparum* and *P. gallinaceum* oocyst development, although it also presented deleterious effects to mosquitoes when expressed in transgenic anophelines, as an active enzyme. In this work, we expressed in bacteria and purified a mutant form of PLA<sub>2</sub> (mPLA<sub>2</sub>). When mixed with *P. gallinaceum* infected blood, at 0,1 μmol/l, the mPLA<sub>2</sub> recombinant protein was able to reduce up to 79% the number of oocysts in *Aedes fluviatilis* mosquitoes. In order to generate transgenic mosquitoes we used the *Anopheles gambiae* peritrophic matrix protein 1 promoter (AgPer1) to drive the mPLA<sub>2</sub> expression. The hybrid gene construct (AgPer1/mPLA<sub>2</sub>) was inserted into the *piggyBac* transposable element which contains the green fluorescent protein gene (EGFP), as a marker. By injecting 770 *Ae. fluviatilis* embryos 15 families were formed and, after screening more than 22,000 larvae, we obtained four transgenic lines (27% of transformation efficiency). EGFP expression was observed on eyes and neural tubes of mosquito larvae, pupae and adult. Employing specific primers we confirmed, by PCR, the presence of the EGFP (700bp), as well as the mPLA<sub>2</sub> (500bp) genes. The effector molecule (mPLA<sub>2</sub>) mRNA expression was specific to female midguts and was not induced by a blood. By confocal microscopy we detected the presence of the mPLA<sub>2</sub> protein only in transgenic mosquitoes' midguts. Moreover, parasite blocking assays showed significant reduction on *P. gallinaceum* oocyst numbers (17.5 to 68.5%) in all four transgenic lines. This study shows the importance of parasite effector molecules and the generation of transgenic mosquitoes as an alternative malaria control strategy as well as a tool in studies of vector/parasite interactions.

## INTRODUÇÃO

---

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Situação epidemiológica da Malária

A Malária é hoje considerada um dos principais problemas de saúde pública. A estimativa é de 350 a 500 milhões de novos casos a cada ano no mundo, resultando em mais de um milhão de mortes, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade e mulheres grávidas em países africanos. Devido à sua ampla incidência e aos efeitos debilitantes possui grande impacto econômico ao reduzir a capacidade produtiva da população acometida (WHO, 2006; MS, 2006a).

Aproximadamente 90% dos casos de malária concentram-se no continente africano, na África sub-sahariana, e os 10% restantes são distribuídos entre o Sudeste Asiático, América Latina e Oceania (WHO, 2005).

Cerca de três bilhões de pessoas vivem em áreas com risco de infecção pelos agentes causadores da malária (Guerra *et al.*, 2006). Na América Latina, o Brasil é o país que mais registra casos de malária e a região da Amazônia Legal é responsável pela quase totalidade da doença no país. Em 2006, foram registrados cerca de 540 mil casos, dos quais 99,9% na Amazônia Legal, considerada a área endêmica do país (MS, 2007).

O aumento do número de casos de malária no mundo pode ser atribuído principalmente à resistência dos parasitas às drogas, à resistência dos mosquitos aos inseticidas utilizados, e à falta de uma vacina eficaz disponível comercialmente (WHO, 2005). No Brasil o aumento da doença ocorreu em função do crescimento da imigração e a colonização da floresta Amazônica (McGreevy *et al.*, 1989; Trigg e Kondrachine, 1998). Nas décadas de 70 e 80, o desenvolvimento intensificado da Amazônia acelerou os processos migratórios, atraindo moradores de outras regiões do país, graças aos projetos de colonização e expansão da fronteira agrícola, construção de estradas e hidrelétricas, projetos agropecuários, extração da madeira e mineração. Nesta região as precárias condições socio-econômicas da população migrante determinaram a rápida expansão da doença (FUNASA, 2001a; Silveira e Rezende, 2001). Além dessa situação, houve também problemas com invasões em áreas urbanas, como foi o caso de Manaus/AM e Porto Velho/RO, as quais se têm configurado como importantes locais de infecção por receberem intenso fluxo de pessoas que se deslocam de outros municípios em busca de oportunidades de trabalho ou em razão de necessidades comerciais. Como conseqüência, esses

municípios concentraram 21,1% do total de casos de malária ocorridos na região Amazônica em 2005 (MS, 2006a).

Vários programas de controle da malária têm sido propostos nos últimos 60 anos. Em 1955, a OMS elaborou o Programa de Erradicação da Malária que incluía o controle vetorial através do uso de inseticidas de ação residual como o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) e o tratamento em massa com um antimalárico de baixa toxicidade (cloroquina). Este esforço mundial para erradicar a doença apesar de bem sucedido em vários países, apresentou efeito limitado em extensas regiões da África, Ásia e América do Sul, incluindo a Amazônia brasileira. Todavia, a emergência da resistência dos parasitas aos antimaláricos e as limitações ao uso de inseticidas desencadearam um agravamento da situação epidemiológica da malária nas três últimas décadas. O reconhecimento deste panorama fez com que a estratégia de combate ao problema fosse modificada ao longo dos anos. Após quase metade de um século, o primeiro programa de erradicação global da malária foi proposto através de uma iniciativa denominada *Roll Back Malaria* (RBM) criada em 1998 pela OMS, Unicef e o Banco Mundial. Esta iniciativa tem como objetivo manter a malária sob controle reduzindo a mortalidade e a carga econômica da doença, em países subdesenvolvidos, através de ações intersetoriais. O objetivo é reduzir a transmissão da malária até 2010 (López-Antuñano, 1992; Passos e Fialho, 1998, Loiola *et al.*, 2002).

Em 2002, o projeto genoma do principal parasita causador da malária humana, o *Plasmodium falciparum*, foi finalizado através de um consórcio estabelecido entre vários laboratórios (Gardner *et al.*, 2002). Além disso, os genomas de ambos hospedeiros, humano e o mais importante vetor da malária, o mosquito *Anopheles gambiae* foram concluídos (Mural *et al.*, 2002; Holt *et al.*, 2002). Estas descobertas abriram perspectivas que levam a novas estratégias de controle da doença, no que se refere ao controle vetorial, quimioterapia e desenvolvimento de vacinas (Gardiner *et al.*, 2005).

## 1.2. Os parasitas da malária e o ciclo biológico dos plasmódios

Os parasitas causadores da malária pertencem ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados. Destas apenas quatro espécies parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*,

*P. malariae* e *P. ovale*. Este último é distribuído na África sub-sahariana e nas ilhas do oeste Pacífico (Collins e Jeffery, 2005).

O ciclo de vida do parasita é do tipo heteroxênico requerendo dois tipos de hospedeiro: o invertebrado, onde o parasita alcança a maturidade sexual denominado hospedeiro obrigatório e o vertebrado, onde ocorre a multiplicação assexuada, o hospedeiro intermediário. A transmissão da malária ao homem se dá quando fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* inoculam parasitas durante o repasto sanguíneo.

### 1.2.1. Ciclo do parasita no hospedeiro vertebrado

A infecção de um hospedeiro vertebrado pelo parasita da malária começa quando uma fêmea do mosquito *Anopheles* infectada com espécies de *Plasmodium* injeta parasitas na derme do hospedeiro. Neste estágio do ciclo de vida, o parasita é um esporozoíto, uma célula alongada e ativamente móvel. Após a injeção, os parasitas movem-se através da derme, entram em contato com um vaso sanguíneo, caem no sistema circulatório (~70%) ou linfático (~30%) até atingirem o fígado (Amino *et al.*, 2006; Vanderberg e Frevert, 2004). No sistema circulatório, os esporozoítos, ou formas exoeritrocíticas (EEF), rapidamente atingem os sinusóides hepáticos, em um movimento conhecido como *gliding* sobre o endotélio e interagem com proteoglicanos de heparan sulfato nos hepatócitos. Posteriormente atravessam a camada sinusoidal, possivelmente através das células de Kupfer (Frevert *et al.*, 2006). Uma vez seqüestrados nos sinusóides, os esporozoítos atingem e invadem os hepatócitos. Os esporozoítos que foram drenados pelo sistema linfático são encaminhados para os linfonodos proximais, onde a maioria é degradada, mas alguns podem parcialmente desenvolver e liberar antígenos das formas EEF (Amino *et al.*, 2006).

Ao entrarem nos hepatócitos, as EEF se diferenciam em trofozoítos, que, após sofrerem várias divisões por esquizogonia, formam os esquizontes. Quando chegam à fase madura estes se rompem liberando milhares de merozoítos que caem na corrente sangüínea e invadem as hemácias. Sturm *et al.* (2006) mostraram que os merozoítos também podem ser encontrados em vesículas denominadas merossomos os quais são capazes de transportar centenas de merozoítos para a corrente sangüínea, assim como protegê-los contra as células de Kupfer do fígado.

Após emergirem dos hepatócitos e invadirem os eritrócitos os merozoítos

iniciam a fase intraeritrocítica. A interação dos merozoítos com o eritrócito envolve o reconhecimento de receptores específicos entre eles o antígeno do grupo sanguíneo Duffy para *P. vivax* e várias glicoforinas e outros receptores para *P. falciparum* (Deepak *et al.*, 2004). Ao invadir o eritrócito, o parasita passa por outros estágios de desenvolvimento, os trofozoítos e esquizontes. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, uma pequena parcela de parasitas se diferencia em gametócito, que não mais se divide e que seguirá o seu desenvolvimento no mosquito vetor (Fig. 1. a - c).

O período de incubação da malária varia de acordo com a espécie de *Plasmodium*, cerca de 12 dias para *P. falciparum*, 14 dias para *P. vivax*, e 30 dias para *P. malariae*. Se o contágio for por meio de transfusão sanguínea, o período de incubação normalmente é breve, variando conforme a quantidade de parasitas presentes (MS, 2006b). A fase inicial da doença é caracterizada por mal-estar, cefaléia, cansaço e mialgia que geralmente precedem à clássica febre da malária. O ataque paroxístico agudo (acesso malárico) coincide com a ruptura das hemácias ao final do ciclo eritrocítico, levando a liberação de produtos tóxicos, metabólitos do parasita, e produção de citocinas inflamatórias que desencadeiam o aparecimento da anemia e febre (Jaramillo *et al.*, 2004).

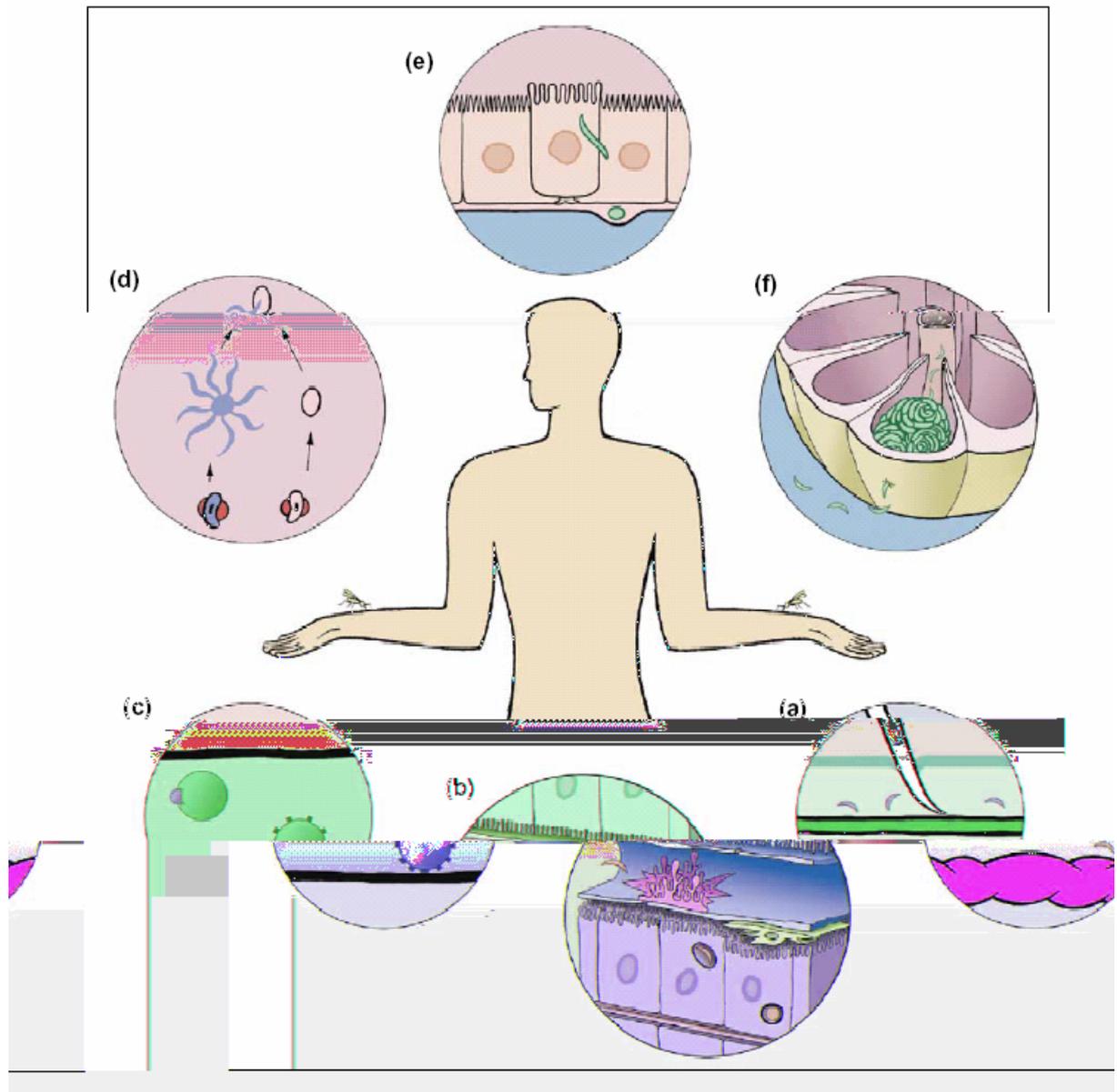
### 1.2.2. Ciclo do parasita no hospedeiro invertebrado

A jornada do parasita no mosquito começa logo após a ingestão de sangue infectado contendo os gametócitos (Baton e Ranford-Cartwright, 2004). No lúmen do intestino médio do mosquito, gametócitos fêmea (macrogametócito) e macho (microgametócito) amadurecem e, dentro de alguns minutos, diferenciam em gametas após exposição a fatores ambientais e específicos do mosquito que podem variar nas diferentes espécies de *Plasmodium*. Estes fatores incluem queda da temperatura em 5°C, aumento no pH, e exposição ao ácido xanturênico (Billker *et al.*, 1998). Uma cascata de transdução de sinal resulta na liberação de cálcio no citoplasma do gametócito, causando o início do desenvolvimento e a emersão dos eritrócitos. Uma proteína quinase dependente de cálcio, CDPK4, é ativada em gametócitos machos e regula a exflagelação e a geração de oito gametas móveis (Billker *et al.*, 2004).

Após a fusão dos gametas forma-se o zigoto, por volta de 1h após a ingestão de sangue infectado, que amadurece e diferencia-se em oocineto. Este estágio

invasivo do parasita é capaz de penetrar no epitélio do intestino médio do mosquito 24h após a alimentação sanguínea e se transformar em oocisto (Lehane e Billingsley, 1996; Shahabuddin, 1998).

O oocisto desenvolve-se no espaço entre a lâmina basal e o epitélio do intestino médio (Meis e Ponnudurai, 1989). Em cada oocisto, são ativadas as maquinarias de replicação do DNA e de síntese de proteínas para a amplificação assexuada do número de parasitas, conhecido como esporogonia. No final da esporogonia ocorre a produção de milhares de parasitas no estágio de esporozoíta confinados dentro de um oocisto encapsulado (Meis *et al.*, 1992). Conseqüentemente, a cápsula do oocisto se torna mais fina e fragmentada, possibilitando o aparecimento de perfurações, por onde os esporozoítos escapam (Strome e Beaudoin, 1974; Meis *et al.*, 1992). Na hemolinfa, os esporozoítos seguem em direção à glândula salivar, infectando os lóbulos lateral-distal e mediano. A invasão das células epiteliais da glândula salivar ocorre através da formação de um vacúolo parasitóforo, seguido pela interação dos esporozoítos com a lâmina basal e invaginação do plasmalema da célula do hospedeiro. Um vacúolo parasitóforo é formado ao redor dos esporozoítos durante seu escape das células da glândula salivar. A ação final do parasita no mosquito é a ruptura deste vacúolo e a migração dos esporozoítos para os ductos salivares, de onde são ejetados (Pimenta *et al.*, 1994). Ainda não está claro como os esporozoítos atingem a glândula salivar. Evidências recentes sugerem que a quimiotaxia possa desempenhar esta função (Akaki e Dvorak, 2005); entretanto, outros estudos propõem que se trata de um processo passivo, mediado somente pela circulação da hemocele (Rodriguez e Hernandez-Hernandez, 2004). No próximo repasto sanguíneo, o mosquito é capaz de inocular as formas infectantes, e, conseqüentemente, iniciar o ciclo assexuado no hospedeiro vertebrado (Fig. 1. d - f).



**Figura 1: Ciclo de vida do *Plasmodium*.** (a) Esporozoítos (em verde) são injetados juntamente com a saliva pela probóscide do mosquito (branco) na pele, onde eles invadem os capilares (vermelho) ou vasos linfáticos (amarelo). (b) Parasitas (verde) no fígado são mostrados como esporozoítos nos sinusóides dentro de um hepatócito e se desenvolvem no vacúolo parasitóforo. Uma célula de Kupfer, macrófagos hepáticos que delinea o endotélio do sinusóide, e uma célula estrelada que habita o espaço de Disse que separa as células endoteliais dos hepatócitos, são mostrados em amarelo e azul, respectivamente. (c) um merozoíto (verde) invade um eritrócito, enquanto um outro eritrócito é infectado e adere ao endotélio devido à geração de protuberâncias (*knobs*) na superfície do eritrócito. (d) Gametócitos macho (azul) e fêmea (rosa) que são capturados pelos mosquitos diferenciam-se em gametas. Após a fertilização (parte de cima) um zigoto se forma. (e) Um oocineto (verde) passa através do epitélio do intestino médio. A célula invadida é extruída do epitélio para o lúmen do intestino. Um oocisto jovem é mostrado abaixo na lâmina basal face a hemolinfa do mosquito (azul). (f) Esporozoítos (verde) passam da hemolinfa através das células da glândula salivar e cavidade salivar, onde se agregam (Adaptado de Amino *et al.*, 2005).

### 1.3. Mosquitos Transmissores da Malária

#### 1.3.1. Humana

Todos os transmissores da malária humana são insetos do gênero *Anopheles*, dos quais apenas reduzido número tem importância para a epidemiologia da malária. Os adultos (fêmeas) são hematófagos e as fases imaturas são aquáticas. Seu ciclo biológico compreende as seguintes fases: ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto (Consoli e Oliveira, 1998).

Os anofelinos têm ampla distribuição no mundo. Na África, o mosquito *Anopheles gambiae* Giles, 1902 é o principal vetor da malária humana, atuando na transmissão do *P. falciparum* que causa a forma mais grave da doença. Este vetor é altamente antropofílico, sendo atraído por habitações humanas, onde se alimentam e realizam a postura dos ovos. A oviposição é realizada em pequenas porções de água expostas à luz solar, produzidos pelas chuvas. Além de haver um aumento do número de larvas durante as estações chuvosas, a abundância anual deste mosquito correlaciona-se altamente com a chuva. As larvas podem ser encontradas em áreas agrícolas. Durante a estação seca, a reprodução ocorre em porções de águas temporárias deixadas por córregos secos ou associadas com a ocupação humana (Gwadz e Collins, 1996).

Na Ásia e no oriente médio o mosquito *Anopheles stephensi* Liston, 1901 é um importante vetor de malária humana. Esta espécie com distribuição subtropical tem sido descrita como zoofílica, embora tenha sido documentada atividade antropofílica em algumas regiões geográficas do Iraque e Índia (Hati, 1997). Em laboratório, o *An. stephensi* é utilizado, em países da Europa e Estados Unidos, como um excelente modelo de malária em roedores para elucidar as interações entre o parasita e o hospedeiro (Levashina, 2004; Anderson *et al.*, 2004; Baldacci e Menard, 2004; Ishino *et al.*, 2004).

No Brasil, mosquitos do subgênero *Nyssorhyncus* são considerados os mais importantes vetores do parasita da malária, sendo representados por *Anopheles darlingi* Root, 1926, *An. aquasalis* Curry, 1932, *An. albitarsis* Lynch-Arribalzaga, 1878 dentre outros (Consoli e Oliveira, 1998). O *An. darlingi* é considerado o principal vetor da malária apresentando comportamento altamente antropofílico (Deane, 1989; Rosa-Freitas *et al.*, 1998; Tadei *et al.*, 1998; Souza-Santos, 2002), embora já tenha sido capturado picando animais (Deane, 1989; Charlwood, 1996).

Sua colonização em laboratório não foi possível ainda, pois essa espécie necessita de grandes espaços para realizar o vôo nupcial ou cópula. Este anofelino está presente em todo o interior do país, exceto nos locais mais secos do Nordeste, no extremo Sul e em locais de maior altitude, sendo mais freqüente ao longo de grandes rios e próximos às florestas (Forattini, 1962; Consoli e Oliveira, 1998; Neves, 2005). O *An. aquasalis* é encontrado em locais onde existem águas salobras. A presença desses mosquitos em áreas distantes do litoral se deve à presença de cloretos no solo ou à invasão do terreno pelas marés, como ocorre na área de Belém, Pará (Consoli e Oliveira, 1998). Seus criadouros são coleções de águas paradas e salobras ensolaradas ou parcialmente sombreadas. É uma espécie cuja densidade populacional é diretamente influenciada pela presença das chuvas: menor com o avançar da época mais seca; maior quando se iniciam ou finalizam os períodos chuvosos.

Outro *Nyssorhynchus*, que também exerce importante papel na transmissão, é o *An. albitarsis* Lynch- Arribáizaga, 1878. Este mosquito faz parte de um complexo de pelo menos quatro espécies, o *An. albitarsis* s.s., o *An. albitarsis* sp. B, o *An. deaneorum* Rosa Freitas, 1989 e o *An. marajoara* Galvão e Damasceno, 1942. A existência do complexo foi sugerida por análises comportamentais (Galvão e Damasceno, 1944) e confirmada através de análises bioquímicas (Steiner *et al.*, 1982, Narang *et al.*, 1993), citológicas (Kreutzer *et al.*, 1976) e morfológicas (Linthicum, 1988; Rosa-Freitas, 1989) e, posteriormente pela análise do DNA por RAPD (*random-amplified polymorphic DNA*) (Wilkerson *et al.*, 1995). Em 2004, Lima e colaboradores confirmaram o alto nível de isolamento reprodutivo entre duas espécies do complexo, o *An. albitarsis* s.s. e o *An. deaneorum*, evidenciando que se tratam de espécies distintas. O complexo Albitarsis é amplamente distribuído no Brasil e parece não ter preferências com relação aos seus locais de criação. As formas imaturas têm sido encontradas nos mais variados tipos de criadouros, temporários ou permanentes, naturais ou artificiais, totalmente expostos à luz solar ou completamente sombreados. Embora sejam muito disseminados não apresentam hábitos uniformes, com relação ao ambiente humano. Assim, enquanto em certas regiões apresentam preferência zoofílica e exófila, em outras manifesta acentuada antropofilia, procurando insistentemente freqüentar habitações humanas (Forattini, 1962; Consoli e Oliveira, 1998).

Vários outros anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus* são hoje considerados vetores secundários ou vetores potenciais, por serem principalmente exofílicos,

zoofílicos e crepusculares, mas na ausência dos seus hospedeiros preferenciais ou nas épocas de elevada densidade, podem se alimentar no homem com dada freqüência. Nesse caso passam naturalmente a se infectar em algumas áreas endêmicas de malária, particularmente na Amazônia. Entre as espécies de vetores secundários, incluídas no subgênero *Nyssorrhynchus*, estão: *An. strodei* Root, 1926 *An. braziliensis* Chagas, 1907, *An. nuneztovari* Galbadon, 1940, *An. oswaldoi* Peryassú, 1922, *An. triannulatus* Neiva e Pinto, 1922, *An. evansae* Brethes, 1926 e *An. galvaoi* Causay, Deane, Deane, 1943. Além de possuírem hábitos hematofágicos que não lhes permitem freqüente contato com o homem, as espécies de *Anopheles* supracitadas são geralmente pouco susceptíveis aos *P. vivax* e *P. falciparum*, com exceção do *An. nuneztovari* (Consoli e Oliveira, 1998). Além das espécies acima, reconhece-se igualmente o papel de transmissores de malária três anofelinos de Mata Atlântica do subgênero *Kerteszia*: *An. cruzii* Dyar e Knab, 1903, *An. bellator* Dyar e Knab, 1906 e *An. homunculus* Komp, 1937 (Consoli e Oliveira, 1998).

### 1.3.2. Aviária

Um grande número de espécies de mosquito é capaz de transmitir a malária aviária quando infectado com *P. gallinaceum*, *P. juxtannucleare* entre outras espécies de plasmódios aviários. Aproximadamente 25 espécies de *Aedes* são susceptíveis à infecção com *P. gallinaceum* (Garnham, 1966). O vetor natural do *P. gallinaceum* foi descrito por Niles *et al.* (1965) como sendo o mosquito *Mansonia crassipes*. Em condições de laboratório, dois mosquitos têm sido empregados como vetores de malária aviária. São eles o *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e o *Aedes fluviatilis* Lutz, 1904 (Eyles, 1951; Táson de Camargo e Krettli, 1978; Daher e Krettli, 1980).

O mosquito *Aedes aegypti* é susceptível à infecção pelo *P. gallinaceum*, no entanto oferece riscos na transmissão de outras doenças como dengue e febre amarela. É um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas regiões tropical e subtropical. Seus criadouros preferenciais são os recipientes artificiais, tanto os abandonados pelo homem a céu aberto e preenchidos pelas águas das chuvas, como aqueles utilizados para armazenar água para uso doméstico. As fêmeas de *Ae. aegypti* restringem seus hábitos hematofagos aos horários diurnos, sendo o pico de maior atividade no amanhecer a antes do crepúsculo vespertino. Atacam o homem e por vezes animais domésticos, a qualquer hora do dia. Seus ovos são

resistentes à dessecação o que possibilita sua manutenção na estação seca (Consoli e Oliveira, 1998).

O *Aedes fluviatilis* é um excelente vetor experimental para malária aviária principalmente em países onde o *Ae. aegypti* oferece riscos na transmissão de doenças (Garnham, 1966). Apresenta vasta distribuição neotropical onde se estende desde a Nicarágua até a Argentina. São mosquitos comuns em locais silvestres, semi-silvestres, suburbanos, bem como urbanos. Constitui um excelente modelo experimental, pois além de não transmitir doenças ao homem, é uma espécie de fácil manutenção em laboratório (Consoli, 1976). Em condições experimentais, apresenta hábitos antropofílicos, podendo sugar o sangue de outros mamíferos, aves e répteis. No ambiente urbano, é comum em criadouros associados à atividade humana, no ambiente silvestre cria-se em escavações em rochas que acumulam água das chuvas. Os ovos de *Ae. fluviatilis* ao contrário dos ovos de *Ae. aegypti* não resistem à dessecação por muitos dias (no máximo 30, em laboratório) (Consoli, 1976, Consoli e Willians, 1978, 1981, Forattini, 1965).

O modelo de malária aviária oferece algumas vantagens que são o baixo custo, a facilidade de manutenção das galinhas e a reprodutibilidade deste sistema (Collins *et al.*, 1986). Além disso, diversas pesquisas têm demonstrado a proximidade evolucionária entre o *P. gallinaceum* e o *P. falciparum* através de análises filogenéticas dos genes que codificam a proteína circunsporozoíta (CSP) e a proteína relacionada a trombospondina (TRAP) (McCutchan *et al.*, 1996; Templeton *et al.*, 1997; Polley *et al.*, 2005).

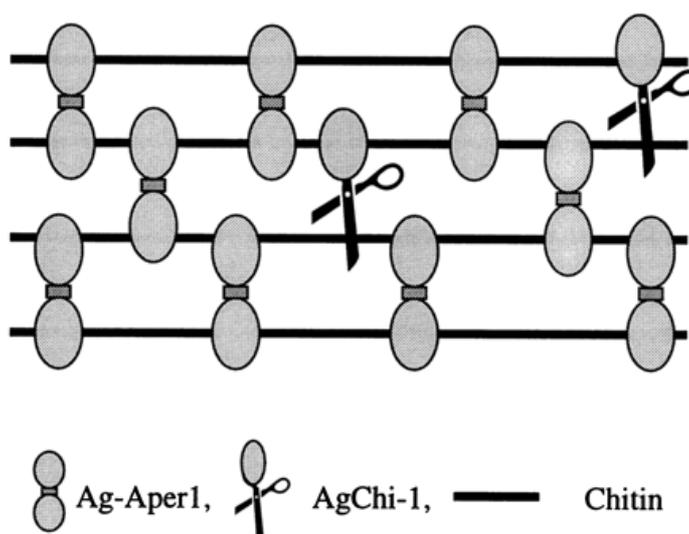
#### **1.4. Fisiologia da digestão em mosquitos e interação com o plasmódio**

##### **1.4.1 Matriz peritrófica e enzimas digestivas**

Após a ingestão sanguínea ocorre a formação da matriz peritrófica (MP) na maioria dos insetos hematófagos, consistindo de uma estrutura semipermeável extracelular produzida pelo epitélio e formada por quitina, proteínas e proteoglicanos, que protege o intestino médio (Wigglesworth, 1930; Peters, 1992). Há dois tipos de MP em insetos, diferenciando-se de acordo com suas propriedades e locais de síntese. A MP tipo 1 é uma estrutura espessa (usualmente entre dois a 20µm) produzida pelas células secretoras de todo ou parte do intestino médio. A secreção da MP tipo 1 é ativada pela distensão dramática do epitélio do intestino médio que ocorre durante a ingestão sanguínea (Freyvogel e Jaquet, 1965). Muitos

insetos hematófagos, incluindo mosquitos, formam a MP tipo 1 após a alimentação sanguínea. A MP tipo 2 é fina (usualmente menos do que 1 $\mu$ m) e é sintetizada continuamente a partir de um órgão especializado, a cárdia (ou pró-ventrículo), o qual está localizado na junção do intestino posterior e médio. Mosquitos e muitos outros insetos hematófagos produzem MP tipo 2 durante a fase larvária e tipo 1 durante a fase adulta.

As proteínas são os principais componentes da MP na maioria dos insetos (Lehane, 1997; Wang e Granados, 2001). Elas correspondem de 22 a 55% da massa total da MP de mosquitos adultos (Moskalyk *et al.*, 1996, Wang e Granados, 2001), usualmente se observa, por eletroforese unidimensional, a presença de cerca de 12 proteínas, cuja maioria é glicosilada (Peters, 1992; Lehane, 1997). Várias destas proteínas da MP têm sido identificadas (Elvin *et al.*, 1996; Casu *et al.*, 1997; Wang e Granados, 1997). Shen e Jacobs-Lorena (1998), clonaram o gene da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae*, AgPer1, mostrando que a proteína prevista apresenta dois domínios de ligação à quitina conectada por uma seqüência curta ligadora, que contribuem para a formação de uma estrutura tridimensional, quitina-AgPer1 (Fig. 2). Em 2005, Shao *et al.*, identificaram a partir de uma biblioteca de cDNA, uma nova proteína da matriz peritrófica de *Ae. aegypti*, denominada peritrofina 50 (*Ae*-Aper50), que apresenta cinco domínios de ligação à quitina. O gene desta proteína é expresso exclusivamente no intestino de fêmeas e sua expressão é fortemente induzida após a alimentação sanguínea.



**Figura 2: Modelo proposto para a participação da AgPer1 e de AgChit (uma quitinase específica do intestino) na formação e manutenção da estrutura da MP.** Os dois domínios de ligação à quitina da proteína AgPer1 ligam as cadeias poliméricas de quitina para formar uma rede tridimensional, enquanto que a AgChit1 se liga à quitina hidrolisando-a, resultando na ruptura local e formação de descontinuidades na rede. Adaptado de Shen e Jacobs-Lorena, 1998.

A quitina é um polímero linear de N-acetilglicosamina, encontrado no exoesqueleto e também na MP de inúmeras espécies de insetos (Kramer e Muthukrishnan, 1997). Os insetos podem apresentar quantidades variáveis de quitina na MP, mas geralmente corresponde de 3 a 13% (Ibrahim *et al.*, 2000; Wang e Granados, 2001). A quitina da MP produz uma estrutura fibrosa, a fibra de quitina, que é a forma cristalizada deste polímero, capaz de se intercomunicar com moléculas de proteínas. A quitina provavelmente contribui para a resistência da MP, de modo que esta possa suportar compressão e distensão (Terra, 1996; Lehane, 1997).

Um outro componente da matriz peritrófica são os proteoglicanos, macromoléculas formadas de proteínas e glicosaminoglicanos ligados covalentemente. Estes têm sido encontrados na maioria das MPs (Eisemann e Binnington, 1994; Terra, 1996; Lehane, 1997), e estão possivelmente, envolvidas nas propriedades de resistência e permeabilidade da MP (Tellam, 1996).

A MP de insetos é uma analogia ao muco gastrintestinal em mamíferos e muitas das funções desempenhadas são semelhantes (revisado por Tellam, 1996; Lehane, 1997; Wang e Granados, 2001; Shao *et al.*, 2001). As funções da MP ainda não estão totalmente claras, no entanto, acredita-se que possa atuar facilitando a digestão sanguínea, como uma barreira de proteção, prevenindo a invasão de vírus, bactérias, e outros patógenos (Peters, 1992; Jacobs-Lorena e Oo, 1996; Lehane, 1997). Além disso, em mosquitos, a MP também desempenha uma importante função na proteção do epitélio do intestino médio de grandes quantidades de derivados do heme que são bioprodutos da digestão sanguínea (Páscoa *et al.*, 2002), bem como na assimilação e eliminação de íons tóxicos de amônia (Kato *et al.*, 2002), tornando-a um alvo potencial para o controle de insetos (East *et al.*, 1993; Casu *et al.*, 1997).

O processo de digestão sanguínea nos insetos é facilitado majoritariamente através da síntese de uma série de enzimas do intestino do inseto. Entre elas estão as tripsinas, quimiotripsinas e as carboxipeptidases. Existem duas formas de tripsina, as tripsinas precoces e as tripsinas tardias. A primeira é denominada tripsina precoce por apresentar-se em baixos níveis e ser sintetizada nas primeiras 4-6 horas após o repasto sangüíneo no lúmen intestinal. A segunda já é sintetizada entre 8-36 horas após o repasto sangüíneo, apresenta-se em altos níveis no lúmen intestinal e por isso foi denominada tripsina tardia. Esta enzima hidrolisa a maioria das proteínas da alimentação sangüínea (Barilas-Mury *et al.*, 1995). Lu *et al.* (2006),

demonstraram por meio da técnica de RNAi que a atividade da tripsina precoce não é necessária para a ativação transcricional da tripsina tardia.

Para completar a proteólise e o rendimento de aminoácidos da alimentação sangüínea, a atividade endoproteolítica deve ser complementada por exopeptidases. Resíduos de aminoácidos alifáticos são sequencialmente clivados na porção carboxiterminal pela carboxipeptidase (Edwards *et al.*, 2000). O RNAm da carboxipeptidase (CP) de *An. gambiae* é expresso 3-4h após a alimentação sanguínea enquanto em *Ae. aegypti* é expresso somente após 24h no intestino médio (Edwards *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 2000), onde se desenvolvem os estágios iniciais do *Plasmodium*. Acredita-se que o promotor da CP tenha atributos desejáveis para dirigir a expressão de genes de bloqueio e a invasão do parasita ao intestino do mosquito (Edwards *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2000).

As quimiotripsinas também desenvolvem um papel importante na digestão de insetos (Terra e Ferreira, 1994). A atividade de quimiotripsina foi encontrada em todos os anofelinos testados até o momento como: *An. stephensi*, *An. albimanus* e *An. quadrimaculatus* (Hörler e Briegel, 1995). Genes de quimiotripsinas foram identificados em *Ae. aegypti* e *An. gambiae* (Jiang *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 2000). Vizioli *et al.* (2001) clonaram dois genes de quimiotripsina de *An. gambiae* (*Anchym1* e *Anchym2*), e observaram que a expressão de ambos genes, induzidos após alimentação sangüínea, apresentaram uma cinética similar àquela observada nas tripsinas tardias (*Antryp1* e *Antryp2*), complementando a digestão do sangue. Em contraste às tripsinas tardias que persistem na sua forma ativada, as quimiotripsinas persistem por um tempo curto no lúmen intestinal, antes de serem rapidamente degradadas.

#### 1.4.2. Invasão do epitélio intestinal pelo plasmódio

A primeira barreira que o oocineto enfrenta em sua migração para a saída do intestino médio do mosquito é a matriz peritrófica (MP), uma estrutura acelular que envolve o bolo sangüíneo (Peters, 1992; Jacobs-Lorena e Oo, 1996; Lehane, 1997). Para atravessar a MP a secreção de uma quitinase é essencial para a penetração desta barreira por *P. falciparum* e *P. gallinaceum*, mas parece ser menos importante para *P. berghei* (Shahabuddin *et al.*, 1996; Sinden *et al.*, 2004). Para atravessar o epitélio intestinal e interagir com a lâmina basal, os oocinetos precisam penetrar no citoplasma das células (Vlachou *et al.*, 2004; Sinden *et al.*, 2004; Ishino *et al.*, 2006;

Siden-Kiamos *et al.*, 2006; Baton e Ranford-Cartwright, 2004). Um único oocineto pode invadir várias células as quais se tornam apoptóticas e são extruídas do epitélio por um mecanismo de restituição de actina, variável entre as diferentes interações de mosquitos/parasitas (Barilas-Mury e Kumar, 2005).

Existem alguns modelos que explicam a invasão do oocineto no epitélio intestinal. O modelo proposto por Shahabuddin e Pimenta (1998), sugere que oocinetos de *P. gallinaceum* invadem um tipo celular específico no intestino de *Ae. aegypti*, que expressa altos níveis de ATPase vesicular, menos basófilo, desprovido de microvilosidades e com o citoplasma menos osmiofílico, as chamadas células de Ross. Mais tarde, foi proposto um novo modelo, a teoria da bomba relógio, em que oocinetos de *P. berghei* invadem células com microvilosidades que não expressam altos níveis de ATPase no intestino de *An. stephensi*. Estas células perdem as microvilosidades e induzem a expressão de óxido nítrico sintetase (NOS). Desta forma, a célula invadida é extruída do epitélio, por um anel de actina, permitindo o reparo epitelial, sem perda de sua continuidade (Han *et al.*, 2000). Mais recentemente, foi proposto por Gupta *et al.* (2005), que durante a invasão de oocinetos de *P. berghei* e *P. gallinaceum* o epitélio do intestino médio dos mosquitos *An. stephensi* e *Ae. aegypti* é reparado por um mecanismo que envolve a formação de um cone de actina agregando a base da célula que aproxima seqüencialmente, expelindo o conteúdo celular no lúmen do intestino médio. No entanto, embora muitos oocinetos invadam o intestino, uma grande fração de parasitas é perdida durante a transição oocineto-oocisto devido à reação imune do mosquito que envolve a lise ou melanização (Bladin *et al.*, 2004; Osta *et al.*, 2004).

### **1.5. Controle de mosquitos transmissores de doenças**

Na década de 50, o controle da malária focalizava-se no uso de DDT e outros inseticidas, os quais contribuíram para a erradicação da doença em muitos países. Entretanto, problemas associados com o custo econômico, impactos ambientais, possíveis efeitos sobre a saúde humana e principalmente a resistência dos anofelinos vetores de malária aos inseticidas conduziram a substituição dos inseticidas para novas alternativas de controle (Oaks, 1991; Curtis, 1994; WHO, 2005).

Organismos biológicos capazes de parasitar ou preda mosquitos podem ser utilizados como uma medida de controle biológico, entre eles bactérias, predadores

e fungos. Larvicidas bacterianos, baseados no uso do *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* (Bs) têm sido utilizados principalmente para o controle de vetores de filariose e outras doenças virais (WHO, 2005). A propriedade inseticida destas bactérias é devido à síntese de cristais protéicos, durante a esporulação, causando toxicidade às larvas. Apesar dos avanços nessa área de controle, ainda há muitos impedimentos quanto ao uso desse método em grande escala na prática operacional de rotina, considerando os custos, o baixo efeito residual, e a intolerância à exposição direta da luz solar (FUNASA, 2001b; Lee e Zairi *et al.*, 2005).

O uso de peixes larvicidas tem sido difundido em várias partes do mundo como alternativas auxiliares no controle de doenças como a malária e ou a dengue. Peixes da família *Poeciliidae* e *Cyprinodontidae* têm sido utilizados com sucesso em vários países. O *Gambusia affinis* é muito eficiente em água limpa enquanto o *Poecilia reticulata* tolera altas temperaturas e pode ser usado com sucesso em águas poluídas organicamente (FUNASA, 2001b).

Estudos recentes têm focalizado o uso de fungos entomopatogênicos para controle de mosquitos no campo e no laboratório, alternativa útil para os inseticidas convencionais (Blanford *et al.*, 2005; Scholte *et al.*, 2005). A co-aplicação de fungos com inseticidas tem sugerido como um mecanismo para solucionar o problema da resistência aos piretróides utilizados. Além disso, moléculas isoladas recentemente de fungos entomopatogênicos têm apresentado efeito direto sobre o *P. falciparum*. (Rukachaisirikul *et al.*, 2004).

Com o avanço das técnicas de biotecnologia, o interesse no controle genético de vetores tem aumentado. O objetivo principal consiste na propagação da esterilidade ou outros fatores genéticos desejados nas gerações sucessivas. Atualmente, uma das estratégias utilizadas para o controle genético de insetos de importância agrícola, baseia-se na técnica do inseto estéril (SIT). Esta técnica consiste na esterilização de machos pelo uso de irradiação ou substâncias esterilizantes (Knipling, 1959).

### **1.6. A engenharia genética como estratégia de controle de parasitas**

Uma metodologia descrita como estratégia de controle de parasitas é baseada no uso de um sistema genético letal induzido em fêmeas, dominante, repressor (RIDL), proposto como uma melhoria para o SIT. Este sistema é

constituído por dois componentes, um gene que expressa uma proteína ativadora da transcrição, que é reprimido com tetraciclina (tTa), e um elemento promotor que ativa a expressão de um gene letal (tRe). Na ausência de tetraciclina, tTa se liga ao tRe levando a expressão do gene letal. Assim, a interrupção no fornecimento de tetraciclina para o inseto a ser liberado resulta na morte da fêmea. O acasalamento do macho RIDL liberado com a fêmea selvagem resulta na morte da progênie feminina e assim conduz à redução populacional. O RIDL tem sido desenvolvido em *Drosophila* (Thomas *et al.*, 2000) e está sendo adaptado para *Aedes* (Touré *et al.*, 2004).

Mais recentemente, com o método de paratransgênicos, é possível a utilização de bactérias capazes de colonizar o intestino médio do mosquito produzindo moléculas efetoras que possam inibir o desenvolvimento do parasita causador da malária (Riehle e Jacobs-Lorena, 2005). No entanto, este método requer o estudo de moléculas capazes de eliminar ou inibir o desenvolvimento destes patógenos no mosquito. Riehle *et al.* (2007) expressaram duas moléculas anti-plasmódio em bactérias, que foram capazes de inibir (de 23% a 41%) o desenvolvimento de *P. berghei* em mosquitos *An. stephensi*.

O uso de insetos transgênicos vetores de doenças humanas foi proposto como uma estratégia inovadora contra doenças transmitidas por insetos (Anon, 1991). A tecnologia de mosquitos transgênicos refratários a doenças é baseada na produção de uma linhagem transgênica competitiva de mosquitos, carregando gene(s) de bloqueio inserido a um elemento de transposição para fixar os genes na população.

### **1.6.1. Insetos vetores transgênicos como estratégia de controle de parasitas**

#### **1.6.1.1. Uso de Transposons para transformação de insetos**

Na década de 1940, estudos genéticos desenvolvidos por Barbara McClintock mostraram a existência de elementos genéticos de transposição (TE) no genoma de milho que afetavam o gene que conferia pigmentação aos grãos. Estes elementos têm a capacidade de se moverem no genoma devido à presença do gene que codifica a enzima transposase, e ocupam porções significativas do genoma da maioria dos eucariotos. Por exemplo, no mínimo 46% do genoma humano é constituído por transposons (Lander *et al.*, 2001). De acordo com seu mecanismo

de transposição podem ser agrupados em duas categorias: elementos de Classe I, que medeiam a transposição de RNA, e de Classe II, mediadores da transposição de DNA. Desta forma, os transposons constituem uma ferramenta valiosa para o estudo da expressão gênica e produção de organismos transgênicos (Watson *et al.*, 2004).

O primeiro exemplo de sucesso de transformação de um inseto veio com o importante artigo de Rubin e Spradling (1982), que utilizaram um vetor contendo o elemento de transposição *P*. Entretanto, este vetor se mostrou específico para *Drosophila*. Desta forma, a atenção dos pesquisadores passou a ser direcionada para outros sistemas de transposição. No final da década de 80, estudos demonstraram a existência do elemento de transposição *hobo*, encontrado em várias espécies de *Drosophila*, desenvolvido em um vetor para transformação (Blackman e Gelbart, 1989; Blackman *et al.*, 1989). No entanto, este transposon se mostrou menos eficiente do que o elemento *P* na transformação de insetos não-drosofilídeos (Daniels *et al.*, 1990).

Um grande avanço na transformação de células germinativas de insetos veio com o uso de um sistema constituído por dois vetores, um contendo o elemento de transposição e o outro contendo o gene da transposase, denominado vetor auxiliar (*Helper*). Esse sistema, chamado bipartido possibilita a integração do transgene, logo após a microinjeção, tornando-se estável. Nesse caso, como o plasmídeo auxiliar não contém as seqüências do elemento de transposição, este é perdido no processo de divisão celular. Com isso, o transposon se torna inativo no genoma do organismo.

Enquanto os elementos *P* e o *hobo* tinham sido geralmente limitados à transformação de *Drosophila*, pelo menos quatro outros sistemas de transposons da classe II passaram a serem utilizados na transformação de outros insetos (Handler, 2001).

A primeira transformação de um inseto não-drosofilídeo foi possível com o elemento *Minos* isolado de *D. hidei* (Franz e Savakis, 1991). Este elemento apresenta 1,4kb, que ao contrário de outros transposons da Classe II tem repetições terminais invertidas de 100pb, e sua unidade de transcrição tem somente um íntron. O elemento *Minos* foi primeiramente utilizado para a transformação de *D. melanogaster* e subseqüentemente, demonstrada em lepidópteros (Klinakis *et al.*, 2000), dípteros, como o mosquito *An. stephensi* (Catteruccia *et al.*, 2000b) e, recentemente em células de mamíferos (Drabek *et al.*, 2003).

Mais recentemente, com a utilização de outros elementos de transposição, já

foi possível obter mosquitos transgênicos, vetores de viroses e de malária. A primeira transformação estável de um mosquito foi publicada por Coates *et al.* (1998) com o transposon mariner, *Mos1* e por Jasinskiene *et al.* (1998) (com transposon *Hermes*) trabalhando com *Ae. aegypti*, os quais utilizaram um gene marcador de cor de olhos. O elemento mariner foi descoberto em *D. mauritiana* em associação com o alelo instável da cor de olhos (Jacobson *et al.*, 1986). Apresenta um tamanho de 1,3kb com seqüências de repetições invertidas de 28pb, e tem a especificidade de inserir-se em sítios TA. Para a transformação de *Ae. aegypti* com este elemento, o gene da transposase do vetor auxiliador foi regulada pelo promotor de uma proteína de choque térmico, HSP82 (Coates *et al.*, 1998). O elemento *Hermes* apresenta um tamanho de 2,7kb tendo uma seqüência de repetição invertida de 17pb, similar ao *hobo*, cria uma duplicação de 8pb no sítio de inserção. Além de sua participação na transformação de mosquitos *Ae. aegypti*, também foi utilizado na transformação de vários insetos, tais como, *Tribolium castaneum* (Berghamer *et al.*, 1999), *Stomoxys calcitrans* (O'Brochta *et al.*, 2000) e *Culex quinquefasciatus* (Allen *et al.*, 2001).

Um grande avanço na técnica veio com o uso do elemento de transposição *piggyBac*. Este elemento móvel apresenta um tamanho de 2,4kb, seqüências repetidas invertidas nas extremidades de 10-30pb (Cary *et al.*, 1989). Ele foi derivado de um baculovírus infectando larvas da mariposa, *Trichoplusia ni* e tem a capacidade de inserir-se em sítios específicos, TTAA, no genoma (Fraser *et al.*, 1996). Este transposon vem sendo utilizado para a transformação de várias espécies de organismos abrindo novos horizontes na transformação de insetos (Handler e Harrell, 1999, 2001a; Handler e Maccombs, 2000; Grossman *et al.*, 2000; Peloquin *et al.*, 2000; Lobo *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2000, Kokoza *et al.*, 2001, Ito *et al.*, 2002, Nolan *et al.*, 2002, Moreira *et al.*, 2002), de células de mamíferos (Ding *et al.*, 2005) e de parasitas, como *P. falciparum* (Balu *et al.*, 2005). Recentemente, foi demonstrado que uma transposase quimérica, contendo o domínio de ligação Gal-4 em sua porção amino-terminal, presente no plasmídeo *Helper*, foi capaz de aumentar a atividade de transposição do elemento *piggyBac* além de direcionar as integrações para sítios específicos no genoma de mosquitos *Ae. aegypti* (Maragathavally *et al.*, 2006), tornando este sistema de transformação ainda mais específico.

O desenvolvimento da técnica de transformação de mosquitos vetores de parasitas tem crescido rapidamente nos últimos anos com grandes conquistas. O direcionamento da pesquisa desde a caracterização de promotores específicos para

determinados órgãos até a descoberta de genes antiparasíticos específicos pode ser facilmente aplicável em diversos sistemas de associação de vetores/parasitas, o que facilita a difusão destas técnicas para outras espécies de insetos vetores onde ainda não foi tentada a técnica de transformação.

#### 1.6.1.2. Uso de genes marcadores e seus promotores para transformação

Os genes marcadores são utilizados para permitir a identificação de organismos transgênicos. Expressando o gene marcador, o mosquito transgênico será diferenciado dos mosquitos selvagens verificando, assim, o sucesso da transformação. Inicialmente, genes de resistência a inseticidas e antibióticos eram utilizados como marcadores para transformação de mosquitos (Miller *et al.*, 1987; McGrane *et al.*, 1988; Morris *et al.*, 1989). Este método apresentava muitas limitações no que se refere à sobrevivência e à seleção das larvas transformadas. Mais tarde, o uso de genes que resgatavam a coloração do olho passou a ser utilizado mostrando eficiência na identificação de *Ae. aegypti* transgênico (Jasinskiene *et al.*, 1998). No entanto, este marcador só se aplicava em espécies que possuíam mutantes para a cor dos olhos, para que o resgate da coloração original fosse possível, após a incorporação do gene marcador.

Um grande avanço na técnica foi à utilização da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* ou GFP), pois esta tem a vantagem de funcionar em várias espécies de animais, incluindo insetos (Pinkerton *et al.*, 2000; Horn e Wimmer, 2000, Catteruccia *et al.*, 2000b, Kokoza *et al.*, 2001), células de mamíferos (Cheng *et al.*, 1996) e em espécies de protozoários como *P. berghei* e *P. falciparum* (De Koning-Ward *et al.*, 1998; Kadekoppala *et al.*, 2000).

O gene da proteína GFP foi clonado primeiramente por Prasher *et al.* (1992) de uma água viva (*Aequorea victoria*), com o objetivo de entender a biologia da bioluminescência do organismo. A clonagem desse gene expandiu sua aplicação para inúmeras áreas da pesquisa biológica, uma vez que poderia ser usado como um marcador, inclusive para identificação de organismos transgênicos. Cormack *et al.* (1996) e Yang *et al.* (1996) realizaram experimentos com um gene mutado desta proteína que apresenta uma expressão amplificada do GFP (*enhanced green fluorescent protein* ou EGFP) que vem sendo utilizada em vários sistemas de transgenia.

Outras variações do espectro da GFP já foram utilizadas como, por exemplo, o azul (ECFP) e o amarelo (EYFP) (Horn *et al.*, 2002). Semelhantes a EGFP, ambas foram consideradas eficientes marcadores na transformação, porém o ECFP apresentou uma fluorescência um pouco mais fraca que os outros (Horn e Wimmer, 2000). Outro marcador bastante utilizado é a proteína fluorescente vermelha (dsRed) que apresenta uma fluorescência mais intensa que o GFP e pode se diferenciar deste quando são co-expressos (Handler e Harrell, 2001b; Nolan *et al.*, 2002).

Dentre os promotores constitutivos utilizados para genes marcadores, estão o promotor da poliubiquitina de *Drosophila melanogaster* que foi usado com o marcador EGFP para gerar e identificar os transgênicos de alguns insetos (Handler e Harrell, 1999, 2001b; Heinrich *et al.*, 2002) e um promotor do gene da actina de *D. melanogaster* que funcionou adequadamente para os mosquitos *Ae. aegypti*, *An. stephensi* e *Culex quinquefasciatus* (Pinkerton *et al.*, 2000; Catteruccia *et al.*, 2000b; Allen *et al.*, 2001). Porém, o promotor da actina não dirigiu uma expressão considerável e uniforme em moscas de estábulos, *Stomoxys calcitrans* (O'Brochta *et al.*, 2000). Uma desvantagem da utilização dos promotores constitutivos é que eles funcionam somente entre espécies próximas.

Um promotor considerado específico e que vem sendo bastante utilizado nos ensaios de transgenia é o 3xP3. Este promotor sintético é originário de um fator de transcrição, o Pax-6, que possui importante função no desenvolvimento dos olhos e do sistema nervoso central de todos os animais vertebrados e invertebrados (Callaerts *et al.*, 1997; Tsonis e Fuentes, 2006). A multimerização de um sítio de ligação (P3) do PAX-6 media a expressão do gene de fotorreceptores em *Drosophila melanogaster* (Sheng *et al.*, 1997). Berghammer *et al.* (1999) desenvolveram este promotor baseado em três repetições em tandem do sítio de ligação P3, que dirige a expressão do marcador principalmente para os olhos, mas também direciona para o sistema nervoso central, papilas anais e parte traseira do intestino de *D. melanogaster* (Horn *et al.*, 2000). Este promotor, como os constitutivos, dirige a expressão em todos os estágios de desenvolvimento (embrião, larva, pupa e adulto), o que é interessante, pois o transgênico pode ser detectado logo após a eclosão dos ovos. A expressão em sistemas ópticos permite a identificação de transgênicos em organismos com cutículas espessas e melanizadas. Porém em algumas espécies como a mosca doméstica (*Musca domestica*) e o mosquito *Ae. aegypti*, a pigmentação do olho nos adultos pode reprimir a visualização da fluorescência significativamente (Hediger *et al.*, 2001; Kokoza *et al.*, 2001).

O promotor 3xP3 controlando a expressão do gene codificador da EGFP (3xP3-EGFP) desenvolvido por Berghammer *et al.* (1999) apresentou uma grande eficiência e passou a ser largamente utilizado, comprovando a versatilidade para a transgenia de animais (Horn e Wimmer, 2000). Além disso, por apresentar um tamanho pequeno (1,3 kb), o 3xP3-EGFP permite que a construção dentro de um elemento de transposição se torne pequena, aumentando as taxas de incorporação do gene.

### **1.6.1.3. Caracterização de promotores para direcionar a expressão do gene de bloqueio em mosquitos**

Com o desenvolvimento da transformação estável de mosquitos houve a necessidade de se encontrar e estudar promotores que possam ser utilizados para dirigirem a expressão gênica de genes exógenos em tecidos específicos, ativados pela alimentação sangüínea e com um pico de expressão determinado pelo promotor. Isto é importante no caso de se desejar atingir o alvo que é o parasita/vírus que transmite a doença.

Coates *et al.* (1999) demonstraram que os promotores da maltase e apirase puderam dirigir a expressão de luciferase especificamente nas glândulas salivares de *Ae. aegypti* embora a expressão tenha sido fraca. Catteruccia *et al.* (2005) demonstrou que o promotor da proteína anti-plaquetária de anofelinos (AAPP), específico da glândula salivar de fêmeas, é fortemente induzido após a alimentação sangüínea. Utilizando este promotor, Yoshida *et al.* (2006) produziram mosquitos *An. stephensi* transgênicos, abrindo novas perspectivas no uso de promotores para direcionar a expressão de genes de bloqueio ao parasita.

Kokoza *et al.* (2000) demonstraram uma expressão forte e regulada de um transgene, no corpo gorduroso do mosquito *Ae. aegypti*. Neste trabalho, os autores mostraram que o promotor da vitelogenina pode dirigir uma forte expressão de um peptídeo antibacteriano, a defensina. A expressão do transgene foi induzida pela alimentação sangüínea e a proteína recombinante permaneceu estável por até 22 dias após a indução. Além disto, a defensina produzida pelos mosquitos transgênicos foi biologicamente ativa contra bactérias embora a ação contra o parasita da malária não tenha sido mostrada.

Moreira *et al.* (2000) utilizaram promotores de genes relacionados a enzimas digestivas (carboxipeptidases) específicos do intestino de duas espécies de

mosquitos (*An. gambiae* e *Ae. aegypti*) para dirigirem a expressão de luciferase em *Ae. aegypti*. A expressão desta proteína foi específica do intestino do mosquito e somente em fêmeas, mostrando um pico semelhante à expressão endógena dos genes utilizados como promotores. Grande quantidade de luciferase foi produzida pelo intestino dos mosquitos transgênicos, confirmada pelo forte sinal detectado em análises de imunoblotting.

Abraham *et al.* (2005), utilizaram o promotor da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae* (AgPer1), para dirigir a expressão do gene da PLA<sub>2</sub> em mosquitos *An. stephensi*. A proteína é expressa somente no intestino de fêmeas adultas (Shen e Jacobs-Lorena, 1998) sendo armazenada nas células epiteliais na forma de vesículas, e logo após a alimentação sanguínea é liberada no lúmen intestinal e incorporada à matriz peritrófica (Devenport *et al.*, 2004). A proteína PLA<sub>2</sub> dirigida pelo promotor AgPer1 foi produzida e detectada no intestino por imunoblotting, e sua localização nas células epiteliais do mosquito, foi demonstrada por imunofluorescência e por microscopia de transmissão (Abraham *et al.*, 2005).

#### 1.6.1.4. Genes de bloqueio ao parasita

A inserção de genes exógenos no genoma de um organismo é uma ferramenta de grande importância não só para o estudo de expressão gênica, mas também para a sua utilização em aplicações práticas. Os primeiros trabalhos com mosquitos transgênicos estavam somente relacionados à demonstração da técnica e a expressão de genes marcadores em diversas espécies. Posteriormente, a expressão de genes de bloqueio de parasitas começou a ser utilizada, para possíveis aplicações práticas, como auxiliares no controle da transmissão.

A descoberta de que anticorpos que reconhecem antígenos na superfície das glândulas salivares pudessem interferir na invasão do *Plasmodium* levaram Barr *et al.* (1991) a identificarem um anticorpo monoclonal (4B7) contra a proteína de superfície de *P. falciparum* (Pfs25). Este anticorpo foi capaz de inibir o número de oocistos em mosquitos infectados com *P. berghei*. Outro anticorpo foi utilizado por Brennan *et al.* (2000) que reconhece um antígeno de cerca de 100kDa na superfície das glândulas salivares de *An. gambiae*. Alimentando-se mosquitos infectados com este anticorpo conseguiu-se reduzir consideravelmente a invasão das glândulas salivares por esporozoítos de *P. yoelii*.

Outra metodologia foi estudada por De Lara Capurro *et al.* (2000) com a

expressão de um anticorpo de cadeia única (*single chain antibody*) contra a proteína CSP (*circumsporozoite protein*) do parasita *P. gallinaceum* utilizando o vírus Sindbis como vetor. Esta proteína é um antígeno predominante da superfície dos esporozoítos e talvez necessária para o reconhecimento e invasão das glândulas salivares. Com a expressão deste anticorpo no mosquito, a invasão das glândulas pelos esporozoítos foi reduzida de 96,8% a 99,9% o que mostra a grande importância de se expressar anticorpos contra as formas dos parasitas como uma estratégia de controle da doença. Essa técnica é adequada no trabalho preliminar para a determinação de expressão de um gene exógeno dirigida por um promotor que não tenha sido testado antes para transformação estável do inseto.

Existem vários peptídeos e moléculas com ação antiparasítica que vêm sendo testados quanto a sua capacidade de inibir o desenvolvimento de plasmódios humanos. Os peptídeos anfipáticos lineares, magaininas e cecropinas, agem reduzindo a formação de oocistos de várias espécies de *Plasmodium* no intestino de mosquitos quando injetados na hemocele (Gwadz *et al.*, 1989). A atividade antiparasítica de ambos os peptídeos os tornam excelentes candidatos para bloqueio da transmissão do parasita no mosquito. Em 2004, Kim *et al.*, produziram mosquitos expressando o gene da cecropina. Neste estudo, os autores mostraram uma redução de cerca de 60% do número de oocistos de *P. berghei* nos mosquitos *An. gambiae* transgênicos.

Os primeiros peptídeos catiônicos ricos em resíduos de cisteína que mostraram ação contra *Plasmodium* foram as defensinas, uma família de moléculas de 4kDa distribuídas em plantas e animais. Dois grupos de defensinas foram capazes de interferir no desenvolvimento de oocistos de *P. gallinaceum*, quando injetados em mosquitos, e esporozoítos isolados *in vitro* (Shahabuddin *et al.*, 1998).

Um outro forte candidato para bloqueio da transmissão do parasita é o peptídeo antimicrobiano gomesina, isolado da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, pois além de inibir o crescimento de bactérias, fungos e levedura, possui efeito sobre o protozoário *Leishmania amazonensis* (Silva *et al.*, 2000). A gomesina tem uma massa molecular de 2270,4 Da, com 18 resíduos de aminoácidos, incluindo um ácido piroglutâmico na parte aminoterminal, e na extremidade carboxiterminal, uma arginina alfa amidada, além de quatro resíduos de cisteína formando duas pontes dissulfeto (Lorenzinni *et al.*, 2003). Em um estudo recente, os autores mostraram que modificações na estrutura do peptídeo gomesina (retirada de uma ou das duas pontes dissulfeto presentes na molécula) resultam na diminuição da

atividade antimicrobiana (Fazio *et al.*, 2006). Em um estudo desenvolvido por nosso grupo foi demonstrado o efeito inibitório da gomesina sobre os estágios sexuais do *P. berghei* e *P. falciparum*, o que torna este peptídeo um importante candidato para uso na obtenção de mosquitos transgênicos (Moreira *et al.*, 2007).

Em 2001, Ghosh e colaboradores identificaram um peptídeo antiparasítico de 12 aminoácidos a partir de uma biblioteca de bacteriófagos, denominado SM1. Este peptídeo é capaz de ligar especificamente aos dois epitélios atravessados pelo parasita da malária, o da glândula salivar e do intestino médio do mosquito. Utilizando esta molécula Ito *et al.* (2002) produziram mosquitos *An. stephensi* expressando um tetrâmero de SM1, capazes de inibir em até 95% o desenvolvimento de *P. berghei*. Estudos posteriores demonstraram que este peptídeo não afetou o desempenho dos mosquitos *An. stephensi* transgênicos (Moreira *et al.*, 2004) além de ser demonstrado recentemente que estes mosquitos possuem desempenho superior aos mosquitos selvagens, quando infectados com *P. berghei* (Marrelli *et al.*, 2007).

Estudos prévios demonstraram que a proteína fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) de venenos animais, inibe a formação de oocistos de espécies de *Plasmodium* quando administradas ao mosquito na alimentação sanguínea (Zieler *et al.*, 2001). As PLA<sub>2</sub>s de venenos animais são enzimas dependentes de Ca<sup>2+</sup>, apresentam uma massa molecular em torno de 14 – 19KDa são extremamente estáveis devido à presença de pontes dissulfeto em sua estrutura. Estas proteínas atuam hidrolisando fosfoglicerídeos para formar lisofosfolipídeos e ácidos graxos, causando a degradação de fosfolipídeos de membrana (Van Deenen e De Haas, 1964). Em 2002, Moreira e colaboradores expressaram o gene da proteína fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) do veneno da abelha em mosquitos *An. stephensi* e observaram um bloqueio de 77 a 99% em oocistos de *P. berghei*. Acredita-se que no intestino dos mosquitos transgênicos a PLA<sub>2</sub> possa atuar como uma barreira física impedindo o reconhecimento dos receptores do epitélio intestinal do inseto, pelos oocinetos e com isso impedindo a invasão do mesmo.

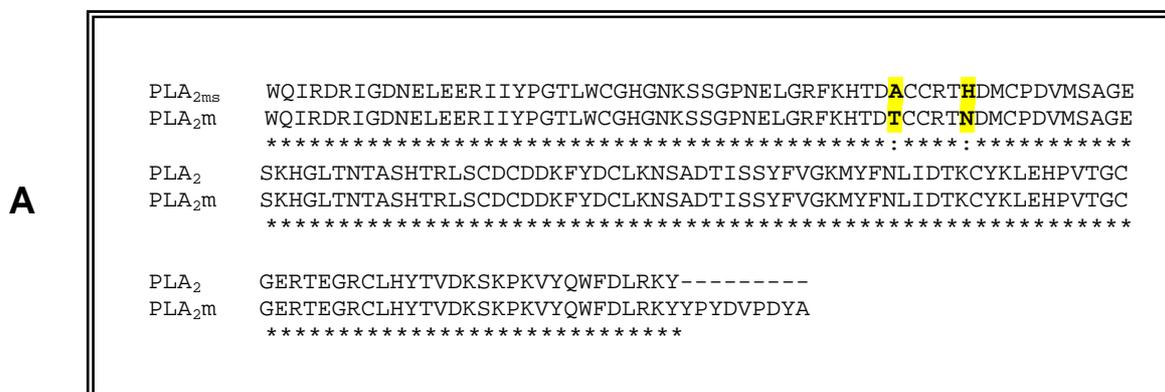
Em 2004, Moreira e colaboradores demonstraram a toxicidade da PLA<sub>2</sub> e seu efeito deletério sobre a produção de ovos de *An. stephensi* transgênicos. Mais recentemente, Abraham *et al.*, (2005) utilizando o promotor da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae* (AgPer1) expressaram a PLA<sub>2</sub> em mosquitos *An. stephensi*. Neste estudo foi novamente demonstrado que a PLA<sub>2</sub> inibe o desenvolvimento de *P. berghei*, mas por microscopia eletrônica foi verificado dano

---

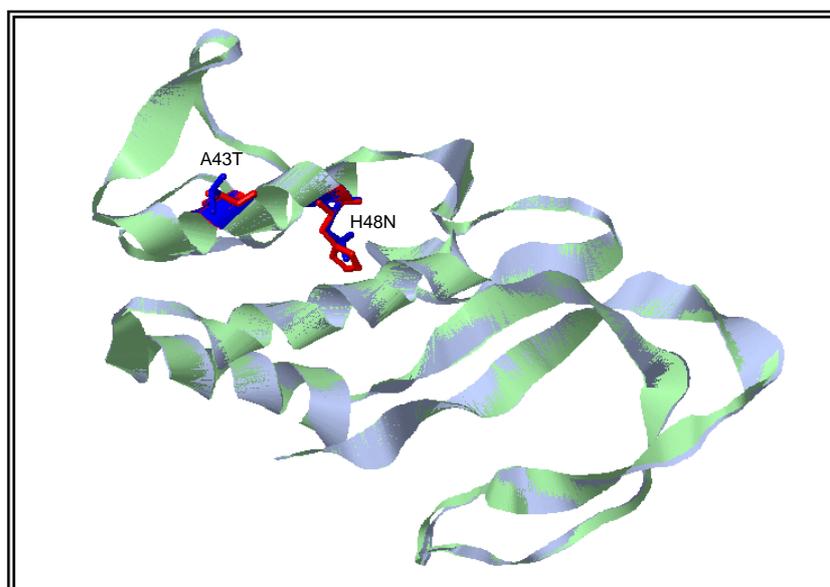
físico da PLA<sub>2</sub> sobre as células epiteliais do intestino dos mosquitos.

Está evidente, nos trabalhos que utilizaram este gene de bloqueio, que a proteína PLA<sub>2</sub> é um excelente candidato para produzir mosquitos transgênicos, no entanto, interfere diretamente no desempenho dos mesmos. Por outro lado, os resultados obtidos por Zieler *et al.*, (2001) demonstraram que se houver uma inativação catalítica da enzima, com o uso do brometo de bromofenacil, ainda assim houve diminuição do número de oocistos, sugerindo que a capacidade de inibição de bloqueio do parasita independe da atividade enzimática. Assim, uma boa estratégia seria a utilização da PLA<sub>2</sub> com uma mutação no resíduo de aminoácido em seu sítio ativo para produzir mosquitos transgênicos bloqueadores da infecção pelo *Plasmodium* sem, possivelmente, afetar o desempenho dos mesmos.

No presente trabalho, com a perspectiva de conhecermos outros genes candidatos de bloqueio ao plasmódio, estudamos o efeito da gomesina, sobre os estágios eritrocítico e sexual bem como o efeito de uma forma mutada da PLA<sub>2</sub> (PLA<sub>2m</sub>). Para a PLA<sub>2m</sub>, utilizamos a seqüência original da PLA<sub>2</sub> contendo uma modificação em um dos resíduos de aminoácidos (histidina na posição 48) onde se encontra o sítio ativo da enzima, tornando-a inativa. Abaixo mostramos uma comparação da fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de abelhas normal e mutada, evidenciando a seqüência de aminoácidos da proteína PLA<sub>2m</sub> com os respectivos aminoácidos mutados (ver figura 3). Um gene híbrido contendo a PLA<sub>2m</sub> foi utilizado para a transformação de mosquitos *Aedes fluviatilis*, vetor experimental da malária aviária.



**B**



**Figura 3: Comparação da seqüência de aminoácidos da fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de abelha original (PLA<sub>2</sub>) com a forma mutada (PLA<sub>2m</sub>):** (A) Seqüência de aminoácidos das proteínas PLA<sub>2</sub> original e PLA<sub>2m</sub> mostrando as modificações realizadas por mutação pontual em negrito e amarelo para tornar a enzima inativa; (B) estrutura tridimensional das proteínas, as substituições de aminoácidos estão indicadas em vermelho, PLA<sub>2</sub>, e em azul, PLA<sub>2m</sub>. Substituição do aminoácido histidina (H) na posição 48 por asparagina (N) e do aminoácido alanina (A) na posição 43 pelo aminoácido treonina (T) (site: [www.trantor.bioc.columbia.edu/SMS/index\\_s.html](http://www.trantor.bioc.columbia.edu/SMS/index_s.html)).

JUSTIFICATIVA

---

---

---

## 2. JUSTIFICATIVA

A malária continua sendo um problema de saúde pública mundial, com problemas envolvendo a resistência dos mosquitos aos inseticidas, resistência dos parasitas às drogas utilizadas e a falta de uma vacina o que leva à necessidade de elaborar medidas alternativas para o controle da doença. Com a descoberta dos genomas humano, do parasita da malária, e do principal vetor transmissor da doença, novas perspectivas surgiram para o controle da doença. Neste contexto, a manipulação genética de mosquitos transmissores de doenças constitui uma medida alternativa para o controle vetorial que precisa ser extensivamente estudada em seus vários aspectos. Estudos de mosquitos e de parasitas ao nível molecular têm se intensificado rapidamente nos últimos seis anos. Trabalhos envolvendo a modificação genética de espécies de mosquitos e o bloqueio do desenvolvimento do *Plasmodium* já foram mostrados. Vários genes de bloqueio têm sido estudados, no entanto, apesar destes resultados serem encorajadores é importante considerar a plasticidade do genoma do plasmódio (Gardner *et al.*, 2002).

Com este trabalho pretendemos ampliar o uso de genes de bloqueio como uma alternativa para o controle de malária, como também adaptar a técnica de manipulação genética para mosquitos brasileiros, transmissores de malária humana. Este estudo é de grande importância para se estudar no Brasil aspectos de interação dos parasitas com os mosquitos vetores, considerando que há diferenças marcantes entre as diferentes espécies associadas (mosquito/ parasita).

## OBJETIVOS

---

---

### 3. OBJETIVO GERAL

Estudar moléculas efetoras como candidatas alternativas para o bloqueio da transmissão de espécies de *Plasmodium* em mosquitos.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do peptídeo antimicrobiano, gomesina, no desenvolvimento de *Plasmodium* spp.
- Produzir a proteína recombinante fosfolipase A<sub>2</sub> mutada (PLA<sub>2</sub>m) para verificar o efeito no desenvolvimento de *P. gallinaceum*.
- Construir um gene híbrido utilizando o promotor da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae*, AgPer1, ligado a um gene antiparasítico, a PLA<sub>2</sub> mutada (PLA<sub>2</sub>m)
- Produzir mosquitos *Aedes fluviatilis* transgênicos expressando o gene da PLA<sub>2</sub>m.
- Caracterizar as linhagens de mosquitos transgênicas utilizando ferramentas celulares e moleculares.
- Verificar a inibição do desenvolvimento de *P. gallinaceum* em mosquitos *Ae. fluviatilis* transgênicos.

## METODOLOGIA

---

---

---

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Colônias de Mosquitos

A colônia de mosquitos *Aedes fluviatilis* foi mantida no insetário do Laboratório de Malária (LAMAL) do Centro de Pesquisa René Rachou, CPqRR, em Belo Horizonte, enquanto a colônia de mosquitos *Anopheles stephensi* foi estabelecida e mantida no Departamento de Microbiologia Molecular e Imunologia, da Escola de Saúde Pública do Instituto de Pesquisas em Malária da Johns Hopkins University, em Baltimore, Maryland, USA. Os mosquitos foram mantidos sob temperatura ( $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa ( $70 \pm 10\%$ ) e fotoperíodo (14h L; 10h E) controlados. As fêmeas de ambas as espécies de mosquitos foram alimentadas com glicose 10% e semanalmente com sangue de camundongos da linhagem Swiss Webster anestesiados com 5mg de Thiopentax (Tiopental sódico) por via intraperitoneal. Três dias após a alimentação sangüínea, um recipiente escuro (6cm de diâmetro) contendo papel de filtro e água, para *An. stephensi*, ou somente água, para *Ae. fluviatilis* era colocado no interior das gaiolas para que as fêmeas realizassem a postura dos ovos. Após 48h, os recipientes eram retirados das gaiolas, sendo o seu conteúdo transferido para bandejas plásticas (30cm x 20cm), previamente identificadas, contendo água desclorada. Após a eclosão dos ovos, as larvas eram distribuídas em bandejas contendo água filtrada. A alimentação das larvas foi realizada diariamente com ração para peixes (Goldfish Colour – *Ae. fluviatilis*) ou ração para gatos (Whiskas – *An. stephensi*). As pupas obtidas eram coletadas e acondicionadas em gaiolas de papelão (Barripel) ou de alumínio, para a emergência dos adultos.

### 4.2. Animais

Camundongos adultos (cerca de 50g) da linhagem Swiss Webster, utilizados nos experimentos, foram produzidos pelo Biotério de produção do CPqRR. Aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*) com cerca de um dia foram fornecidos por uma granja comercial e os coelhos utilizados nos experimentos de imunização foram provenientes da fazenda de experimentação da UFMG, em Igarapé, MG. Todos os animais usados

neste trabalho foram mantidos e tratados sob condições estritas de ética de acordo com as recomendações internacionais de bem-estar do animal (National Research Council, 1996).

### 4.3. Parasitas

Nos experimentos foram utilizadas três espécies de *Plasmodium*: o *P. berghei*, causador da malária murina, o *P. gallinaceum*, da malária aviária e diferentes cepas de *P. falciparum*, causador da malária humana. A cepa 8A de *P. gallinaceum*, proveniente do isolado original de Brumpt, 1937, foi cedida pela Dra. Antoniana U. Krettli, do LAMAL, do CPqRR, e mantida através de passagens cíclicas em aves de um dia e o ciclo do parasita completado em mosquitos *Ae. fluviatilis*. A cepa de *P. berghei* ANKA, clone 2.34, foi mantida em camundongos Swiss Webster através de passagens sanguíneas e completado o ciclo em mosquitos *An. stephensi*. Cepas 3D7-GFP, W2 e NF54 de *P. falciparum* foram adquiridas através do banco de cepas MR4 (Malaria Research and Reference Reagent Resource Center) e mantidas em cultura contínua.

### 4.4. Infecção direta de mosquitos

Mosquitos *Ae. fluviatilis* com três a cinco dias de idade foram privados de solução açucarada por 12h antes de serem alimentados em animais infectados. Aves domésticas, injetadas com a cepa de *P. gallinaceum*, com parasitemia total de 10% em ascendência, foram imobilizados e colocados no topo da gaiola dos mosquitos. Após a alimentação sanguínea os mosquitos eram alimentados com solução de açúcar a 10% suplementada com 0,5g/l de ácido para-aminobenzóico (PABA) e 0,025% gentamicina.

### 4.5. Infecção artificial de mosquitos

Cultura de gametócitos de *P. falciparum* ou sangue de camundongo infectado com *P. berghei* foram utilizados para alimentação artificial de mosquitos, em membrana. Este sistema de alimentação artificial é constituído por uma campânula de vidro onde em sua base é fixada pele de ave doméstica que contém amostras de sangue infectado

e por fora da campânula circula água aquecida (temperatura de 38°C). A campânula é presa sobre a gaiola para que as fêmeas dos mosquitos possam realizar o repasto sanguíneo. Uma hora após a alimentação sanguínea foi feita a separação das fêmeas alimentadas. Sete dias após o repasto sanguíneo (para *Ae. fluviatilis*) e 15 dias (para *An. stephensi*) os intestinos foram dissecados para a contagem dos oocistos. A contagem foi realizada sob microscópio óptico no aumento de 100x.

#### **4.6. Plasmídeos e Reagentes**

Os plasmídeos pGemT (Promega), pET32a (Novagen), foram adquiridos comercialmente, enquanto os plasmídeos pUC19 contendo o promotor AgPer1 e o gene da PLA<sub>2m</sub>, o pSL1180fa e o elemento de transposição *piggyBac* foram gentilmente cedidos pelo Dr. Marcelo Jacobs-Lorena, da Johns Hopkins University. A mutação da PLA<sub>2</sub> foi realizada pelo Dr. Michael Riehle (Universidade do Arizona) e os clones enviados no plasmídeo pGemT. Os demais reagentes utilizados para execução deste trabalho foram adquiridos comercialmente.

#### **4.7. ATIVIDADE ANTIPARASÍTICA DA GOMESINA**

##### **4.7.1. Manutenção do cultivo de *Plasmodium falciparum***

As cepas W2 e 3D7-GFP do *P. falciparum* foram mantidas em cultivo contínuo segundo metodologia descrita por Jensen e Trager, 1977 utilizando-se hemácias humana A+, em Meio RPMI 1640 (Gibco), pH 7,4 (2mM glutamina, 25mM HEPES, 11mM glicose, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, e 40μ/ml de gentamicina) suplementado com 10% de plasma AB<sup>+</sup> inativado, em placas de Petri (60mm x 15mm). A parasitemia do cultivo foi monitorada diariamente a partir da contagem de hemácias infectadas em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. Após atingir 5% de parasitemia, o cultivo foi sincronizado para obtenção de trofozoítas jovens (formas em anel) de acordo com o método utilizando centrifugação e sorbitol 5% estabelecido por Lambros e Vanderberg (1979).

#### 4.7.2. Gomesina e Artesunato

O peptídeo gomesina foi sintetizado manualmente pela metodologia utilizando a estratégia t-Boc, como descrito por Fazio *et al.* (2006). O artesunato de sódio, droga utilizada para tratamento de malária, foi sintetizada e fornecida pela divisão médica da FIOCRUZ/FARMANGUINHOS (Rio de Janeiro).

#### 4.7.3. Atividade in vitro da gomesina contra as formas eritrocíticas de *P. falciparum*

Ao cultivo de hemácias infectadas com trofozoítas jovens de *P. falciparum* com 1,5% de parasitemia inicial, foram adicionadas diferentes concentrações de gomesina (3,1 a 200 $\mu$ M) e da droga padrão utilizada como controle, o artesunato (1,1 a 35,4nM). A avaliação da atividade das drogas foi realizada segundo o método semi-automatizado descrito por Desjardins *et al.* (1979). Neste método, após 24h de incubação da cultura com as drogas, adicionou-se [<sup>3</sup>H]-Hipoxantina (1mCi/ml) (GE) em uma concentração final de 0,5 $\mu$ Ci por poço. Em seguida, a microplaca foi incubada por mais 24h, a 37°C. Após este segundo período de incubação, a microplaca foi colocada a -70°C por pelo menos 1h, para promover a lise das hemácias. As amostras então foram coletadas da placa (96 cell Harvester da Tomtec®) e transferidas para um filtro de fibra de vidro (Filtermat A, Wallac). Esse filtro foi seco em forno de microondas por 3min, seguido da adição de 4ml de líquido de cintilação. A radioatividade foi registrada em leitor automático (MicroBeta Reader® Wallac) e a viabilidade do *P. falciparum*, frente às drogas, medida em relação aos controles sem droga. Os resultados foram avaliados no programa NFIT (MicroCal Software®, Inc) pelas concentrações inibitórias de 50% do crescimento dos parasitas (IC<sub>50</sub>).

#### 4.7.4. Atividade in vitro da gomesina no desenvolvimento de oocinetos de *P. berghei*

Gametócitos maduros de *P. berghei* foram cultivados in vitro, como descrito por Sinden *et al.* (1985). Resumidamente, o sangue de camundongos positivos para

gametócitos foi coletado por punção cardíaca e imediatamente submetido a diluições em meio RPMI 1640 (Gibco), pH 7,5 contendo 2mM HEPES, 2mM glutamina, 1 $\mu$ M XA (ácido xanturênico), 0,37mM hipoxantina e 0,2% de bicarbonato de sódio. Noventa microlitros de sangue foram adicionados às placas de 96 orifícios e incubados por 16h a 20°C. Várias concentrações de gomesina no volume de 10 $\mu$ l foram adicionadas no início da cultura (tempo 0h), 4 e 8h, sendo o número de oocinetos em 10.000 eritrócitos determinado com o uso de um hemacitômetro, no aumento de 400x.

#### **4.7.5. Atividade da gomesina sobre oocistos de *P. falciparum***

Diferentes concentrações de gomesina (0-200 $\mu$ M) foram adicionadas ao cultivo de gametócitos maduros da cepa NF54 de *P. falciparum*, no estágio V (Ifediba *et al.*, 1981), e utilizado para alimentação de mosquitos no sistema de alimentação artificial. No 7º dia após a infecção os mosquitos foram dissecados e o número de oocistos quantificado. O efeito inibitório foi calculado como (média do número de oocistos por intestino de mosquito alimentado com gomesina)/(média do número de oocistos por intestino de mosquito alimentado com PBS 1x) x 100.

### **4.8. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PLA<sub>2m</sub> RECOMBINANTE E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS**

#### **4.8.1. Digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição**

Amostras de DNA contendo cerca de 1 $\mu$ g de DNA do vetor pGemT (contendo o gene da PLA<sub>2m</sub> – 500pb), e do vetor de expressão pET32a, foram digeridas, sequencialmente, com 15U da enzima *Kpn* I e 15U da enzima *Bam*H I (Invitrogen) por 2h a 37°C. Para construção do mapa de restrição do vetor pET32a (contendo o gene da PLA<sub>2m</sub>), cerca de 1 $\mu$ g do DNA plasmidial foi digerida com as enzimas *Xba* I (10U; Invitrogen), *Pst* I (20U; Invitrogen), *Pst* I e *Eco*R I (20 e 15U; New England Biolabs).

#### **4.8.2. Produção de células de *E. coli* competentes**

As células de *Escherichia coli* competentes foram preparadas segundo

metodologia descrita por Nishimura e cols. (1990). Cinquenta microlitros de células de *E. coli* (TOP10, Invitrogen) foram inoculados em 5ml de meio LB (1% NaCl, 1% Triptona, 0,5 % Extrato de levedura, pH 7,0) incubados a 37°C, em agitação, por 16h. Da cultura saturada de bactérias foram recolhidos 500µl e inoculados em 50ml da Solução A (10mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2% de glicose solubilizados em meio LB). A cultura de bactérias em meio enriquecido foi crescida a 37°C, em agitação. Após atingir a D.O. esperada (0,4 a 0,6) a cultura foi transferida para um tubo (Falcon) de 50ml e incubada no gelo por 10min. Após incubação, as bactérias foram centrifugadas a 600 x *g* por 10min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, invertendo-se o tubo lentamente, e o sedimento foi ressuspenso em 500µl da Solução A. À mistura foram adicionados 2,5ml da Solução de Estocagem [36 % glicerina, 12% PEG (8000), 12mM MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, solubilizados em meio LB pH 7,5]. A solução de bactérias competentes foi alíquotada (100µl) em microtubos, sob gelo, e armazenada a -70°C.

#### 4.8.3. Transformação de células competentes

Um volume de 1-2µl das reações de ligação foi adicionado a um volume de 50-100µl de bactérias TOP10 competentes. A mistura foi incubada por 30min em gelo, 30s a 42°C, e 2min no gelo para que as bactérias competentes, com o choque térmico, fossem capazes de incorporar o plasmídeo. As bactérias transformadas foram inoculadas em 900 a 950µl de meio LB, e crescidas por 1h a 37°C, sob agitação. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 2.000 x *g*, o sobrenadante descartado e o sedimento recolhido e plaqueado em meio LB-ágar (meio sólido) contendo 100µg/ml de ampicilina. As placas foram mantidas a 37°C por 16h para crescimento das colônias de bactérias transformadas. Os clones de bactérias foram checados para verificação da presença do inserto nos vetores citados acima, por PCR de colônias e, posteriormente por enzimas de restrição. Para a expressão da proteína recombinante, as células foram crescidas em meio sólido contendo 100µg/ml de ampicilina e cloranfenicol (25µg/ml) para a manutenção do plasmídeo pLysS.

#### 4.8.4. Purificação do DNA plasmidial

Clones de bactérias transformadas foram crescidos em 5ml de meio LB contendo 100µg/ml de ampicilina a 37°C em agitação. Após 12 - 16h, a cultura saturada de bactérias foi centrifugada por 2.000 x *g* por 10min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento utilizado para a extração do DNA plasmidial utilizando-se o kit Mini-prep (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

#### 4.8.5. Expressão da proteína recombinante

O gene da PLA<sub>2m</sub>, com cerca de 500pb, foi clonado nos sítios *Kpn* I e *Bam*HI do vetor de expressão pET32a. O plasmídeo pET-PLA<sub>2m</sub> foi utilizado para transformação de células TOP10. Após a transformação, os clones de bactérias foram selecionados por PCR e suas células armazenadas a -70°C. Alguns clones foram crescidos em 5ml de Meio LB com 100µg/ml de ampicilina por 12 – 16h sob agitação a 37°C. Posteriormente, foi realizada a purificação do plasmídeo utilizando o kit mini-prep (Promega) segundo instruções do fabricante. O DNA plasmidial foi utilizado para transformação de bactérias BL21DE3pLysS, para a expressão da proteína. Cinco mililitros de meio LB foram inoculados com 50µl da cultura de bactérias contendo 100µg/ml de ampicilina e 25µg/ml de cloranfenicol e crescidos a 37°C, por 12 – 16 h, sob agitação. No dia seguinte 50µl desta cultura saturada, foi inoculada em 5ml de meio LB com os mesmos antibióticos acima. A cultura de bactérias foi incubada a 37°C, sob agitação, sendo o crescimento monitorado pela retirada de amostras e leitura em um espectrofotômetro (Beckman), na absorbância de 600nm.

Quando a cultura atingiu o valor de D.O.<sub>A600nm</sub> de 0,6 (cerca de 2h), uma alíquota de 1ml foi retirada e ao restante foram adicionados 1mM de IPTG (Invitrogen) para a indução da expressão da proteína. As culturas de bactérias sem IPTG e com IPTG foram incubadas a 37°C, sob agitação. Em diferentes tempos após a indução foram retiradas alíquotas, que foram centrifugadas a 14.000 x *g* por 1min. O sedimento resultante foi solubilizado em 20µl de PBS 1x pH 7,4 gelado, onde foram adicionados 4µl do tampão de amostra em condições desnaturante e redutora (0,35M Tris-HCl pH 6,8; 0,35M SDS; 30% glicerol; 6% β - mercaptoetanol; 0,175mM azul de bromofenol).

As amostras foram fervidas, por 5min, e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes.

#### **4.8.6. Processamento de bactérias após indução com IPTG**

Após a verificação do melhor tempo de indução da expressão com IPTG 1ml da cultura de bactérias foi inoculada em 500ml de meio LB contendo 100 $\mu$ g/ml de ampicilina e 25 $\mu$ g/ml de cloranfenicol. A cultura de bactérias foi crescida a 37°C por 4h após a adição com 1mM de IPTG. Posteriormente, a cultura foi centrifugada e o sedimento ressuspensão em 250ml do tampão de lise gelado (50mM Tris-HCl pH 7,5, 2mM EDTA, 1mM DTT, 2mg/ml de lisozima). A amostra foi mantida no gelo por 15min e posteriormente, congelada em banho de gelo seco e etanol e descongelada a 37°C. Para completar a lise das células, as bactérias foram processadas em um sonicador (Sonics) em dois ciclos de 30s, seguidos por 30s de incubação no gelo, regulando-se a amplitude do equipamento a 30%. A cultura lisada de bactérias foi centrifugada a 10.000 x g por 16 min, a 4°C. O sobrenadante e o sedimento foram armazenados a -20°C.

#### **4.8.7. Preparação do lisado desnaturado de bactérias**

Ao sedimento foram adicionados 20ml do tampão de lavagem (50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM EDTA, 1mM DTT, 0,5% Triton X - 100). Após duas repetições do processo de centrifugação e lavagem, o último sedimento foi solubilizado em 50ml de água bidestilada, obtendo-se o lisado de bactérias processado.

Uma alíquota contendo 25ml do lisado de bactérias foi centrifugada a 5.000 x g por 10min, a 4°C. O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento solubilizado em 4ml do tampão B (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris, 8M Uréia). A amostra foi agitada lentamente por 10min à temperatura ambiente para assegurar a lise celular das bactérias. Posteriormente, procedemos à lise da amostra em um sonicador (Sonics) com uma amplitude de 40%, em três pulsos durante 5s, seguidos por 5s de incubação no gelo. Para remover os resíduos celulares insolúveis, a amostra foi centrifugada a 5.000 x g por 15min. O lisado celular final desnaturado foi transferido para outro tubo e

---

armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.8.8. Purificação em cromatografia de afinidade**

A purificação da proteína recombinante foi realizada por meio do kit de purificação da Qiagen (QIAexpressionist). O sedimento bacteriano foi ressuspenso no tampão B (100mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mM Tris, 8M Uréia, pH 8,0), e homogeneizado por 45min em homogeneizador. O material foi centrifugado a  $10.000 \times g$  por 45min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Ao sobrenadante foram adicionados 1,25ml de sepharose contendo Níquel [ $\text{Ni}^{2+}$ -NTA (Qiagen)]. A mistura foi homogeneizada por 60min em um agitador orbital à temperatura ambiente. Posteriormente, esta foi aplicada em uma coluna de 10ml (Qiagen), lavada duas vezes com 0,5ml do tampão C (100mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mM Tris, 8M Uréia, pH 6,3). A proteína recombinante foi eluída em 2ml do tampão D (100mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mM Tris, 8M Uréia, pH 5,9) e 2ml do tampão E (100mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mM Tris, 8M Uréia, pH 4,5). As frações obtidas da purificação foram coletadas manualmente em volumes de 0,5ml. Posteriormente as frações eluídas foram reunidas em um volume de 4ml e submetidas à diálise em solução de Uréia em concentrações decrescentes 6, 4, 2, 1, 0,5M, sendo a troca destas realizada por no mínimo 6h para posterior utilização nos demais experimentos.

#### **4.8.9. Dosagem de proteínas**

O conteúdo protéico foi determinado pelo método de Bradford (1976). Para a construção da curva-padrão foi utilizada uma solução de albumina bovina sérica. As amostras protéicas foram lidas em leitor de ELISA (Bio-Rad) a 595nm.

#### **4.8.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Amostras de proteínas foram submetidas a eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de SDS segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970), em gel descontínuo. O gel de separação foi preparado na concentração de 15% de acrilamida, 0,1% de SDS em tampão 1,5M Tris-HCl, pH 8,8, e um gel de concentração contendo 4% de acrilamida, 0,1% de SDS em tampão 1M Tris-HCl,

pH 6,8. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (0,35M Tris-HCl pH 6,8; 0,35M SDS; 30% glicerol; 6%  $\beta$  - mercaptoetanol; 0,175mM azul de bromofenol) e aquecidas a 100°C por 5min para a desnaturação e o rompimento das pontes dissulfeto. A corrida eletroforética foi realizada em um sistema vertical de eletroforese contendo tampão de corrida (0,025M Tris-HCl, 0,192M glicina, pH 8,3, 0,1% de SDS), sob voltagem constante (100V) por 3h. Após a migração das proteínas o gel foi corado segundo o método descrito por Weber e Osborn (1969) com modificações, usando-se a solução contendo 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% de metanol, 10% de ácido acético glacial, por 2h à temperatura ambiente. A descoloração, para visualização das bandas protéicas, foi realizada com solução de ácido acético 10% e metanol 30%. Para verificar as massas moleculares das proteínas analisadas foram utilizados padrões de massas moleculares (m.m.) conhecidas (BenchMark, Invitrogen).

#### **4.8.11. Geração de anticorpos policlonais monoespecíficos contra PLA<sub>2m</sub>**

A proteína recombinante PLA<sub>2m</sub> produzida utilizando o vetor de expressão, pET32a, foi utilizada para imunização de dois coelhos com três meses de idade e pesando entre 2,5-3kg. Para obtenção dos soros pré-imune (controle), uma alíquota de sangue foi retirada através da punção cardíaca, nos animais previamente anestesiados, antes de iniciar o processo de imunização. A proteína PLA<sub>2m</sub> recombinante foi administrada em três doses, todas por via subcutânea, na região da nuca do animal. Na primeira imunização, foram injetados 250 $\mu$ g da proteína recombinante conjugada ao adjuvante completo de Freund (Sigma) na proporção de 1:1, no dorso dos animais. A segunda imunização foi procedida sete dias após a primeira dose, onde foram injetados 125 $\mu$ g da proteína recombinante conjugada ao adjuvante incompleto de Freund (Sigma). A última imunização foi realizada 21 dias após a primeira imunização também utilizando o adjuvante incompleto de Freund. Duas semanas após a última dose de imunização, o sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca e os soros obtidos foram acondicionados em tubos de microc

#### 4.8.12. Ensaio de ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado para analisar a reatividade e a titulação do anticorpo policlonal mono-específico contra PLA<sub>2</sub>m recombinante, produzido em coelhos. Inicialmente, foi feita a sensibilização da placa de 96 orifícios, adicionando-se como antígeno a proteína PLA<sub>2</sub>m recombinante (5µg/ml). Para adsorção do antígeno, a proteína foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35mM NaHCO<sub>3</sub>) e as placas incubadas por 16h a 4°C. A seguir, os poços foram lavados com PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBST), por três vezes, e bloqueados em uma solução de leite desnatado 5% (p/v) diluído em PBST por 1h a 37°C. Após o bloqueio, os poços foram lavados com PBST e incubados em triplicata com os soros dos coelhos anti-PLA<sub>2</sub>m recombinante em diluição seriada de 1:1000 a 1:128.000 em PBST por 1h, a 37°C. Posteriormente, os poços foram lavados com PBST três vezes. Após o processo de lavagem, o conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma), diluído em PBST foi incubado por 1h a 37°C. Os poços foram lavados novamente com PBST (três vezes), sendo em seguida a reação revelada com tampão citrato-fosfato pH 5,0 contendo OPD (ortofenildiamina) na presença de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida adicionando-se 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A densidade óptica foi quantificada com o uso do leitor de ELISA com filtro de 490nm.

#### 4.8.13. Imunoblotting

Cerca de 15µg da proteína PLA<sub>2</sub>m recombinante, dissolvidos em tampão de amostra, em condições desnaturante e redutora, foram aplicados em gel de poliacrilamida e submetidos à eletroforese em condições desnaturantes como descrito no item 4.8.10. Após a eletroforese, procedemos a imunodeteção da proteína PLA<sub>2</sub>m pelo soro pré-imune e o soro contra PLA<sub>2</sub>m segundo método descrito por Towbin *et al.* (1979). As bandas protéicas do gel de eletroforese foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) com poros de 0,45µm, por 1h a 100V. Após a eletrotransferência as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau S, para verificar a transferência das proteínas do gel para a membrana. Em seguida, a membrana foi tratada com tampão bloqueador [10% de leite desnatado (Molico) em

PBS 1x contendo 0,05% Tween 20] (PBST) por 1h, à temperatura ambiente, para bloquear os sítios livres da membrana, sendo em seguida, lavada em PBST, três vezes, por 10min. Anticorpos policlonais produzidos pelos coelhos contra a proteína específica foram adicionados ao tampão bloqueador (3% de leite, PBST). Após 1h a membrana foi lavada, três vezes, por 10min e colocada em contato com o segundo anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Amershan Biosciences/GE), diluído na solução bloqueadora na diluição de 1:2000. A membrana foi novamente lavada como descrito anteriormente. A visualização da reação imunológica foi realizada utilizando-se uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB (diaminobenzidina).

#### **4.9. CONSTRUÇÃO DO GENE HÍBRIDO PARA OBTENÇÃO DE MOSQUITOS TRANSGÊNICOS**

##### **4.9.1. Digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição**

Amostras de DNA contendo cerca de 1µg de DNA do vetor pUC19 [contendo a região promotora da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae* (AgPer1) e a fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de abelhas] foram digeridas com 15U das enzimas *Kpn* I e *Bam*H I (Invitrogen) por 2h a 37°C, para retirada do gene da PLA<sub>2</sub> (Fig. 16, A). Posteriormente, o plasmídeo pUC19/AgPer1 purificado foi ligado ao gene de bloqueio, PLA<sub>2</sub>m. Posteriormente, o plasmídeo foi digerido com 15U da enzima *Pst* I para liberação do fragmento AgPer1/PLA<sub>2</sub>m (Fig. 16, C). Para a construção do mapa de restrição do plasmídeo pUC19 (contendo o gene da PLA<sub>2</sub>m), cerca de 300ng de DNA foi digerido com as enzimas *Xba* I (10U; Invitrogen), *Pst* I (20U; New England Biolabs - NEB), *Eco*R I e *Xba* I (10U; Invitrogen) e *Hind* III (10U; NEB). Para a obtenção do plasmídeo pBacEGFP contendo o fragmento contendo AgPer1/PLA<sub>2</sub>m, cerca de 1µg do plasmídeo pSL1180fa (*shuttle*) foi digerido com a enzima *Pst* I, para possibilitar a clonagem do gene híbrido neste vetor. Posteriormente, após as etapas subseqüentes (descritas abaixo), cerca de 100ng dos vetores *shuttle* e *piggyBac*EGFP, (contendo o gene AgPer1/PLA<sub>2</sub>m), foram digeridos com 3U das enzimas *Asc* I e *Fse* I (NEB) (Fig. 17, A e B). Os DNAs foram adicionados à reação de digestão que continha: tampão da enzima 10x, água estéril, e BSA (somente para as reações de digestão com as enzima

---

*Pst* I, *Asc* I e *Fse* I) e incubados por 2h a 37°C. Os produtos da digestão foram analisados em géis de agarose corados com brometo de etídio.

#### **4.9.2. Defosforilação dos vetores de clonagem**

Após a digestão com as enzimas de restrição os vetores pUC19 e pSLfa1180fa (*shuttle*) foram tratados com a enzima CIAP para desfosforilar o vetor e evitar seu anelamento. Para isso, o DNA dos vetores foi incubado numa mistura contendo 1U da enzima CIAP (Promega), tampão da enzima CIAP 10x diluído em água estéril (Sigma), por 1h a 37°C, sendo posteriormente purificado com o kit de purificação de PCR (Qiagen), segundo instruções do fabricante.

#### **4.9.3. Purificação dos fragmentos de DNA**

Para as etapas de clonagem, após a digestão dos DNAs, foi necessária realizar a excisão dos fragmentos de interesse para a posterior ligação dos mesmos. Os fragmentos foram excisados do gel de agarose, sobre um transiluminador com luz ultravioleta, com auxílio de um bisturi esterilizado e purificados utilizando o kit de purificação QiaexII (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

#### **4.9.4. Ligação dos fragmentos de DNA em vetores de clonagem**

Diversas proporções de vetor: inserto (razão molar) foram testadas, bem como a mistura de cerca de 50ng de DNA dos plasmídeos com cerca de 150ng de DNA do inserto, independentemente de seus tamanhos. Os DNAs4w 1.cionexcis(r041riorilação ura con:ga

KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,4, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mg/ml gelatina), 2μM de dNTPs, 2μM de cada iniciador, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), e amostras contendo 20ng de DNA genômico ou cDNA em um volume final de 15μl. Para amplificação das fitas de DNA senso (Forward - F) e anti-senso (Reverse - R), os iniciadores, foram desenhados com o auxílio dos programas Oligo ou Primer3.

**Tabela 1: Iniciadores utilizados nas reações da PCR.**

Iniciador	Seqüência
PLAMF	5'-GGTACCTGGCAAATCAGGGATAGG-3'
PLAMR	5'-GGATCCCTATCAGGCGTAGTCCGG-3'
EGFPF	5'-GGTGCCCATCCTGGTCGAGC-3'
EGFPR	5'-GCGGTCACGAACTCCAGCAGG-3'
AgPercDNAF	5'-GTGTGGTGCTACTGTTGG-3'
RP49F	5'-GTGAAGAAGCGGACGAAGAAGTT-3'
RP49R	5'-TGCATCATCAGCACCTCCAGC-3'
ACTINAF	5'-AAGGTGTGATGGTCGGTA-3'
ACTINAR	5'-TCATTGCCCCACCAGAAC-3'

As reações foram realizadas em um termociclador automático (Eppendorf) utilizando as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 2min seguidos de 30 ciclos de 95°C por 1min, anelamento a 56°C (para ACTINA), 58°C (para PLAM), 61°C [para RP49 (Gentile *et al.*, 2005)] e AgPercDNAF), e 63°C (para EGFP), por 1min e extensão à 72°C por 1min, seguidos de uma extensão final de 5min a 72°C.

Para a realização da PCR de colônias, clones de *E. coli* presentes nas placas foram transferidos (com auxílio de ponteiras estéreis) para tubos contendo 200μl de meio LB com ampicilina (100μg/ml) e crescidos por 1h a 37 °C, sob agitação. Um volume contendo 25μl da mistura bacteriana foi fervido por 5min a 100°C e centrifugado a 14.000 x g por 5min. Uma alíquota de 5μl foi utilizada na reação de PCR em um volume final de 15μl, para a verificação da amplificação de fragmentos de interesse. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese.

#### 4.9.6. Eletroforese em gel de agarose

Amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel contendo 0,7, 08 e 1% de agarose (Invitrogen) dissolvida em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) dependendo do tamanho dos fragmentos a serem analisados. A mistura foi aquecida em forno microondas até a completa solubilização da agarose, sendo adicionados 5µg/ml de brometo de etídio (Invitrogen). Quando a mistura atingiu a temperatura em torno de 50°C, foi distribuída em um suporte de acrílico, contendo um pente, esperando-se até a solidificação do gel. As amostras de DNA foram misturadas em tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol, 40% sacarose) e aplicadas no gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada em um sistema horizontal (Bio-Rad) a 100V por 30 - 60min. O gel foi visualizado em transiluminador ultravioleta (UVP - Bio-Doc it System).

#### 4.9.7. Dosagem de ácidos nucléicos

A concentração de ácidos nucléicos (DNA ou RNA) foi determinada em um espectrofotômetro a 260nm e a 280nm e a pureza das amostras determinada pela razão A260/A280 nm. A concentração das amostras de DNA de fita dupla foi determinada considerando 1 unidade de absorbância 260nm= 50µg/ml e para RNA 40µg/ml.

Para confirmar as dosagens obtidos por meio do espectrofotômetro, os DNAs foram diluídos e corridos num gel de agarose contendo marcador de 100pb (NEB) que possibilita, por comparação, o conhecimento aproximado da concentração de DNA da amostra.

#### 4.9.8. Sequenciamento de nucleotídeos

Cerca de 80ng dos plasmídeos foram adicionados às reações de PCR contendo 0,33µM dos iniciadores, 1µl de água estéril, 4µl do kit de sequenciamento (DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham) em um volume final de 10µl/reação. A reação de amplificação foi realizada em 35 ciclos (95°C 20s; 58°C 15s;

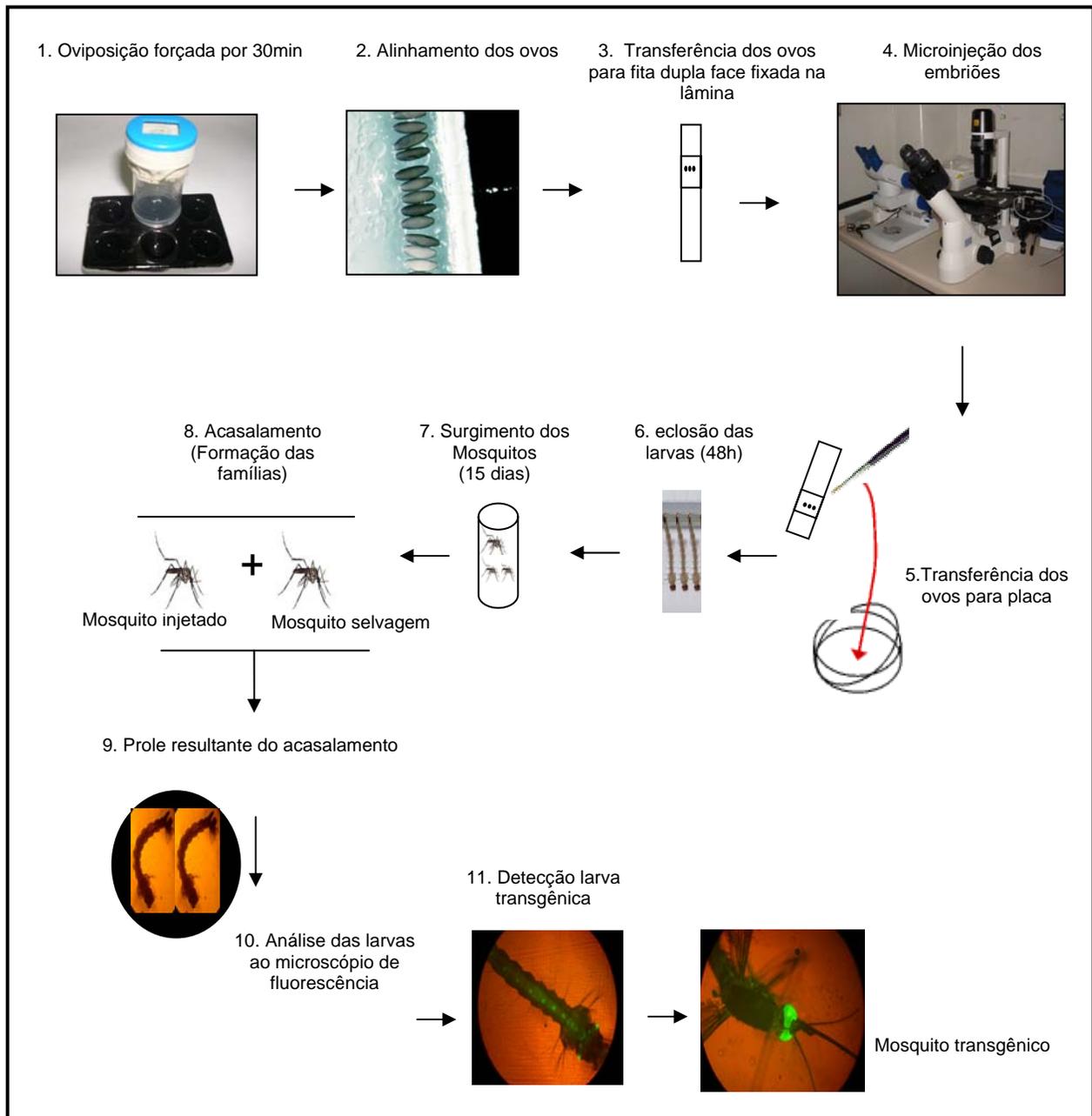
60°C 1min e 20s). O produto amplificado foi transferido para uma placa de sequenciamento, sendo que a cada orifício da placa, contendo as amostras, foram adicionados 750mM de acetato de amônio e 30µl de etanol 96 % (Merck), para a precipitação do produto. A placa foi agitada levemente em um vórtex e, posteriormente incubada por 20min à temperatura ambiente, protegida da luz. As amostras foram centrifugadas (em um rotor para placas) por 45min a 10.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado, invertendo-se a placa rapidamente. Ao sedimento foram adicionados lentamente 100µl de etanol 70% (Merck). As amostras foram novamente centrifugadas por 10min a 10.000 x g. O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento foi incubado por 10min para evaporação do álcool. Ao final do procedimento, o sedimento foi solubilizado em 10µl do tampão de amostra (70% formamida, 1mM EDTA) para sequenciamento automático. As amostras foram aplicadas em um seqüenciador automático Megabace 500 (Amersham Bioscience). Para a análise das seqüências foi utilizado o pacote BioEdit ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioeti.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioeti.html)).

#### **4.10. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE MOSQUITOS TRANSGÊNICOS**

##### **4.10.1. Microinjeção em Embriões**

A técnica de microinjeção foi realizada segundo metodologia descrita por Ito *et al.* (2002) e Moreira *et al.*, (2002) com modificações. Fêmeas de mosquitos *Ae. fluviatilis* de três a cinco dias foram alimentadas em camundongos. Após 48h da alimentação sanguínea, cerca de seis a oito fêmeas foram colocadas em um aparato [Fig. 6 (1)] para realização de postura forçada por cerca de 30min. Ovos de fêmeas fertilizadas, recém ovipostos, foram alinhados sobre um papel de filtro umedecido com tampão isotônico (150mM NaCl, 5mM KCl, 10mM HEPES, 2,5mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,2), com a região posterior do embrião na mesma orientação. Para facilitar a adesão dos embriões na fita dupla-face (Scotch 3M), a fita de papel de filtro, contendo os ovos alinhados, foi seca com o auxílio de papel absorvente pressionando-a em ambos os lados da linha de ovos, nunca sobre os ovos. Após a secagem da fita os ovos foram transferidos para uma fita adesiva dupla face, sobre uma lâmina de microscópio e após breve dessecação (cerca de 2min) foram cobertos com óleo halocarbônico 27 (Sigma). Para a

microinjeção foram utilizados um microscópio invertido (Nikon) modelo TS 100 contendo um micro-manipulador acoplado (Narishige) e um microinjetor Femtojet (Eppendorf). A lâmina contendo os ovos alinhados era posicionada na plataforma do microscópio de forma que a região posterior do ovo, que dá origem à cauda do embrião, ficasse direcionada para o microcapilar de quartzo para ser microinjetado. Os capilares de quartzo, utilizados na microinjeção, foram confeccionados por estiramento no equipamento Sutter nas seguintes condições: Heat= 750, Fil= 4, Vel= 40, Del= 125, Pull= 125. A mistura de DNA foi inserida nos capilares com o auxílio de uma microponteira (Eppendorf). Os ovos foram injetados até cerca de 90min após a postura com uma mistura contendo 0,3µg/µl do elemento de transposição *piggyBac* (AgPer1PLA<sub>2</sub>m) e 0,2µg/µl do plasmídeo Helper, *phsp-pBac*, (que codifica a transposase necessária para a funcionalidade do *piggyBac*, dirigida pelo promotor do gene *hsp70*). Após a microinjeção, os embriões foram transferidos para placas de Petri contendo água desclorada e mantidos no insetário até o nascimento das larvas e posteriormente os adultos. Os mosquitos adultos foram separados de acordo com o sexo, sendo cada fêmea microinjetada colocada em uma gaiola contendo três a quatro machos selvagens, e um macho microinjetado colocado em uma gaiola contendo dez fêmeas selvagens para obtenção da geração F1. Três dias após a formação das famílias (macho microinjetado com fêmeas selvagens, fêmea microinjetada com machos selvagens), as fêmeas receberam alimentação sanguínea. Após 48h da alimentação sanguínea foi colocado na gaiola um copo escuro contendo água filtrada para a coleta dos ovos. Os copos de desova eram retirados das gaiolas e os ovos colocados em bandejas contendo água filtrada até a eclosão. As larvas da geração F1 provenientes das famílias foram analisadas em microscópio ou estereomicroscópio de fluorescência para a detecção da expressão do gene marcador que codifica a proteína verde fluorescente, o EGFP (Fig. 4).



**Figura 4: Metodologia para a obtenção de mosquitos *Aedes fluviatilis* transgênicos:** A primeira etapa consiste em colocar as fêmeas para realizar a postura forçada dos ovos por 30min (1), na segunda etapa, os ovos são alinhados em uma lupa (2) e transferidos para uma fita dupla-face fixada na lâmina (3), na quarta etapa é realizada a microinjeção nos embriões de mosquitos (4). Após a microinjeção os ovos são transferidos para uma placa de Petri (5), após 48h os ovos eclodem dando origem às larvas (6), o ciclo larval dura em média 15 dias até o surgimento do mosquito adulto (7). Após a emergência dos mosquitos, estes são separados por sexo e acasalados com o par correspondente selvagem, para a formação das famílias (8), a prole resultante dos acasalamentos (9) são analisadas ao microscópio de fluorescência no aumento de 40X (10), para a detecção de larvas transgênicas, que irão constituir as diferentes linhagens transgênicas (Adaptação de Rodrigues e Moreira, 2006b).

#### 4.10.2. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico dos mosquitos foi realizada segundo a metodologia adaptada de Black e Munstermann (1996), utilizando fenol-clorofórmio. Mosquitos, cujas cabeças foram excisadas e larvas, foram coletados em tubos de microcentrífuga macerados com o auxílio de um pistilo de plástico em 200µl de tampão de lise (0,1M NaCl, 0,2M sacarose, 0,1M Tris-HCl pH 9,1, 0,05 EDTA, 0,05% SDS), até dissociação completa do inseto. O macerado resultante foi centrifugado a 14.000 x g por 30s e posteriormente, incubado a 65°C por 30min. À mistura foi adicionado 100µg/ml de proteinase K (Sigma) e após homogeneizada foi incubada à 52°C, por 3h. Ao material foram adicionados 200µl de fenol equilibrado (Sigma), sendo as amostras transferidas para um homogeneizador por 10min, à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13000 x g por 15min a 4°C, sendo a parte aquosa resultante da mistura transferida para um tubo estéril. À parte aquosa foram adicionados 200µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) homogeneizando-se, por 10min, à temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas sendo a parte aquosa transferida para outro tubo estéril. Ao sobrenadante foram adicionados 200µl de clorofórmio, sendo a mistura homogeneizada por 10min e centrifugada por 15min a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para tubos estéreis onde foram adicionados 200µl de isopropanol, homogeneizado por 10min à temperatura ambiente. As amostras de DNA genômico precipitado foram removidas com auxílio de uma pipeta Pausteur (com a ponta selada) e transferidas para tubos 1,5ml (Eppendorf), contendo 1ml de etanol 70%. A mistura foi homogeneizada por 10min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as amostras secas ao ar. O sedimento contendo o DNA foi solubilizado em 100µl do tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,5 e mantido a -20°C.

#### 4.10.3. Southern Blot

O número de integrações do gene da PLA<sub>2</sub>m no genoma das linhagens de mosquitos *Ae. fluviatilis* transgênicos foi realizada através da técnica de *Southern Blot*. Aproximadamente 10µg de DNA genômico foram digeridos com 20U da enzima de

restrição *Bgl* II (Promega). Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 0,7% contendo 0,5µg/ml de brometo de etídio. Após a corrida eletroforética o gel foi desnaturado em tampão 0,25M HCl por 10min, tratado com 0,5N NaOH, 1M NaCl por 30min, neutralizado com tampão 0,5M Tris-HCl, pH 7,4, 3M NaCl por 30min à temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi transferido para um sistema de transferência por capilaridade onde foi colocado uma membrana de náilon sobre o gel, várias camadas de papel absorvente sendo utilizado o tampão SSC 10X pH 7,0 (1,5M NaCl, 0,15M C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>) para possibilitar a transferência dos fragmentos de DNA para a membrana. Após 12 – 16h de transferência, a membrana foi colocada em um equipamento de *crosslinking* (Stratagene) para fixação do DNA na mesma.

#### 4.10.4. Preparação e hibridização das sondas radioativas

A sonda utilizada no ensaio de *Southern blot* foi preparada a partir da digestão do vetor *piggyBacEGFP* com a enzima de restrição *Sal* I. O fragmento resultante da digestão de 0,8kb (que corresponde ao braço esquerdo do transposon) foi excisado do gel, purificado e marcado com [<sup>32</sup>P] dCTP conforme protocolo descrito por Feinberg e Vogelstein (1983). A pré-hibridização da membrana foi realizada em 15ml do tampão Church [1% BSA, 500mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM EDTA e 7% de SDS (Church e Gilbert, 1984)] durante 2h a 50°C. Posteriormente, a sonda desnaturada (5min a 95°C e logo após 5min no gelo) foi adicionada à solução de hibridização e incubada durante 14h a 65°C. Após a hibridização, a membrana foi lavada quatro vezes com SSC 2x (300mM NaCl, 30mM C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>) e 0,1% de SDS, à temperatura ambiente. Após a lavagem, a membrana foi transferida para um cassete e exposta ao filme de raio X (Kodak), mantido a -70°C. Após sete dias de exposição, o filme de raio X foi revelado e fixado.

#### 4.10.5. Extração de RNA total

Cinco intestinos e carcaças de mosquitos selvagens e transgênicos, machos e fêmeas, com idades entre três a cinco dias foram dissecados em PBS 1x livre de nucleases, pH 7,2. Todos os tecidos foram imediatamente congelados em banho de gelo seco e etanol e armazenados a -70°C. Para determinar o perfil temporal da expressão da PLA<sub>2m</sub> em mosquitos transgênicos, intestinos de fêmeas foram

dissecados em diferentes intervalos de tempo após a alimentação sanguínea e macerados em 100µl de Trizol (Invitrogen). Após homogeneização e incubação por 5min à temperatura ambiente, 100µl de clorofórmio absoluto foram acrescentados à mistura, seguido de vigorosa agitação e incubação à temperatura ambiente, por 3min. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15min a 4°C, sendo a fase aquosa cuidadosamente transferida para microtubos estéreis de 1,5ml, resfriados em gelo. À fase aquosa foram adicionados 250µl de álcool isopropílico absoluto, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10min e centrifugação a 12.000 x g, por 10min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 500µl de etanol 75% seguido pela centrifugação a 7.500 x g por 5min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco ao ar. O RNA total purificado foi ressuspenso em 15µl de água livre de RNase [tratada com 0,1% de DEPC (Dietilpirocarbonato) por 1h a 37°C e autoclavada] e quantificado nos comprimentos de onda de 260 e 280nm em um espectrofotômetro, sendo posteriormente armazenado a -70°C.

#### **4.10.6. Análise de expressão por meio de RT-PCR**

As reações da transcriptase reversa (RT) foram realizadas após o tratamento de 0,5µg de amostras de RNA total com 1U da enzima DNase (RQ1 RNase-free DNase—Promega), para eliminar qualquer contaminação de DNA. No tratamento das amostras de RNA, além da enzima, foram acrescentados à reação tampão (Tris-HCl 400mM, pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 100mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM) e água tratada com 0,1% de DEPC em um volume final de 10µl. As reações foram incubadas à 37°C, por 30min, adicionando-se em seguida 1µl da solução de parada da reação (RQ1 DNase STOP) e incubando-se a 65°C por 10min, para promover a inativação da enzima. A síntese do cDNA foi realizada segundo instruções do fabricante (Invitrogen) onde às amostras de RNA tratadas com DNase foram adicionados 1µl de oligo dT<sub>15-18</sub> (10mM) e 1µl de dNTP (10mM) seguido de incubação à 65°C por 2min. Posteriormente, foram acrescentados à reação 4µl do tampão da 1ª fita 5x (250mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) e 2µl DTT (Ditiotreitol) 0,1M, homogeneizado e incubado à 42°C por 2min. Para a síntese de cDNA foram adicionadas 200U da enzima MRL-Reverse transcriptase (Invitrogen). As reações foram incubadas à 42°C por 50min e inativadas à 70°C por

15min. As amostras foram preparadas em pares, onde em uma das reações não foi adicionada a enzima transcriptase reversa.

Para a amplificação dos cDNAs específicos as amostras foram submetidas a PCR utilizando iniciadores específicos para o gene de bloqueio, PLA<sub>2</sub>m, e para o gene constitutivo da proteína ribossomal RP49 do mosquito *Aedes aegypti*, utilizado como controle positivo (ver tabela 1).

#### 4.10.7. Ensaio de inibição da formação de oocistos

Mosquitos, selvagens e transgênicos, foram alimentados com sangue infectado com diferentes espécies de *Plasmodium*. No 7º dia (*P. falciparum* e *P. gallinaceum*) após o repasto sanguíneo infectante, foi realizada a contagem de oocistos. Os mosquitos foram anestesiados sob gelo e o estômago excisado do resto do corpo, utilizando-se pinças e estiletos, sob uma lupa de dissecação. A visualização dos oocistos foi facilitada pela coloração dos estômagos com solução de mercúrio-cromo a 2% e a contagem sob um microscópio óptico (aumento de 100x). A atividade de bloqueio do desenvolvimento do parasita foi calculada como na fórmula abaixo:

$$\text{Inibição} = \frac{\text{Média do número de oocistos por intestino de mosquitos selvagens}}{\text{Média do número de oocistos por intestino de mosquitos transgênicos}} \times 100$$

#### 4.10.8. Microscopia confocal

Intestinos de mosquitos selvagens e transgênicos, quatro horas após a alimentação sanguínea (em camundongo) foram dissecados em PBS 1x pH 7,4. Os tecidos foram fixados por 2h em paraformaldeído a 4%, a 4°C. As amostras foram lavadas três vezes em PBS 1x por 5min. Posteriormente, os tecidos foram bloqueados em meio RPMI por 2h à temperatura ambiente. Anticorpos policlonais específicos, produzidos contra a proteína PLA<sub>2</sub>m recombinante (produzidos neste trabalho) e contra PLA<sub>2</sub> comercial (Nordic) diluídos em tampão bloqueador (PBS 1x, BSA 1%, Triton 0,1% - PBT) foram utilizados para a incubação dos tecidos a 4°C por 14h. Após cada tratamento com os anticorpos, os tecidos foram lavados em PBT. Posteriormente, foram adicionados às amostras anticorpos anti-IgG de coelho conjugado ao marcador fluorescente Alexa Fluor 488 (Molecular Probe), diluído na solução bloqueadora

---

(Dakocytomation) na diluição de 1:2000. O núcleo das células foi corado com DAPI (4'6'-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato) (Invitrogen) por 10min. As imagens dos tecidos foram obtidas utilizando um microscópio confocal (Zeiss, modelo LSM 510), nos aumentos de 200x e 400x, com o filtro de 505-550.

#### **4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os experimentos envolvendo a atividade da gomesina sobre a formação de oocistos de *P. falciparum* foram realizados em triplicatas e as médias comparadas, utilizando-se o teste não paramétrico, Teste *t*.

Os experimentos para verificar o grau de bloqueio dos mosquitos transgênicos ao *P. gallinaceum* foram realizados em triplicatas ou quadriplicatas. As médias dos números de oocistos em mosquitos selvagens e transgênicos foram comparados pelo Teste Mann Whitney, com o nível de significância de 1% e 5% .

## RESULTADOS

---

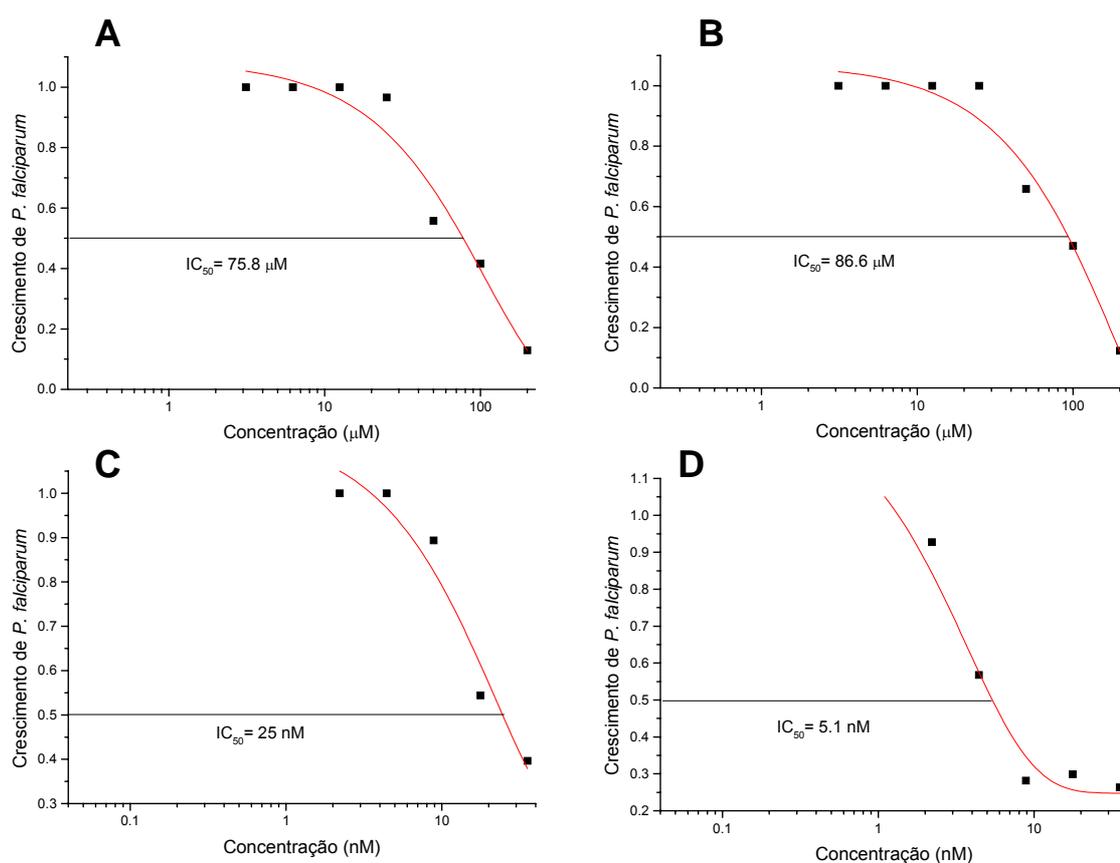
---

## 5. RESULTADOS

### 5. 1. EFEITO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO GOMESINA SOBRE ESPÉCIES DE *Plasmodium*

#### 5.1.1. Efeito da gomesina sobre os estágios assexuados de *Plasmodium falciparum*

O efeito da gomesina sobre o estágio de proliferação intraeritrocítico de *P. falciparum* foi estudado pelo método de incorporação de hipoxantina radioativa. A gomesina foi capaz de inibir o desenvolvimento de ambos os parasitas sensíveis (3D7-GFP) e resistentes à cloroquina (W2) (Fig. 5). Os valores de  $IC_{50}$  variaram de 75,8 (W2) a 86,6 $\mu$ M (3D7-GFP) em experimentos independentes. Por comparação, o  $IC_{50}$  para o artesunato, droga utilizada como controle, variou de 5,1nM (3D7-GFP) a 25nM (W2).



**Figura 5:** Curva dose-resposta da viabilidade de parasitas na presença da gomesina (A, B) e artesunato (C, D) contra a cultura in vitro das cepas W2 (A e C) e 3D7-GFP (B e D) de *P. falciparum*. Os dados são representativos de três experimentos independentes usando artesunato como droga controle, e dois experimentos independentes com gomesina. Cada experimento foi realizado em triplicata.

### 5. 1.2. Efeito da gomesina sobre o desenvolvimento de oocinetos de *P. berghei*

Para determinar o efeito da gomesina sobre a formação e a viabilidade de oocinetos, culturas de gametócitos de *P. berghei* foram incubadas na presença de diferentes concentrações do peptídeo. A gomesina foi adicionada a três intervalos de tempo (0, 4 e 8h após o início da cultura) e a inibição foi obtida através da contagem do número de oocinetos a cada 10.000 eritrócitos em comparação com a cultura controle, onde não foi adicionado o peptídeo (Tabela 2). Quando a gomesina foi adicionada no início da cultura, na concentração de 12,5 $\mu$ M foi capaz de inibir de 54 a 100% a formação de oocinetos, 25 $\mu$ M inibiu de 67 a 100% enquanto em 50 $\mu$ M levou em até 100% de inibição. Quando a gomesina foi adicionada no intervalo de 4 ou 8h após o início da cultura, valores iguais ou maiores que 75% foram observados com 12,5 $\mu$ M, e a mortalidade de 75 – 100% com 50 $\mu$ M, a 4 e 8h respectivamente. Este peptídeo foi capaz de inibir significativamente o desenvolvimento de oocinetos de *P. berghei* (Teste Mann Whitney).

Tabela 2. Efeito in vitro da gomesina sobre a formação de oocinetos de *P. berghei*.

	Concentração gomesina	Número de oocinetos/ 10.000 eritrócitos (% inibição)		
		0h *	4h	8h
Exp. 1	0 $\mu$ M	21	24	20
	12,5 $\mu$ M	10 (54%)	6 (75%)	4 (80%)
	25 $\mu$ M	7 (67%)	6 (75%)	2 (90%)
	50 $\mu$ M	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
Exp. 2	0 $\mu$ M	16	15	16
	12,5 $\mu$ M	4 (75%)	1 (93%)	0 (100%)
	25 $\mu$ M	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
	50 $\mu$ M	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
Exp. 3	0 $\mu$ M	4	4	4
	12,5 $\mu$ M	0 (100%)	1 (75%)	1 (75%)
	25 $\mu$ M	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
	50 $\mu$ M	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
Exp. 4	0 $\mu$ M	23	22	23
	50 $\mu$ M	0 (100%)	0 (100%)	5 (78%)
Exp. 5	0 $\mu$ M	17	15	17
	50 $\mu$ M	0 (100%)	0 (100%)	2 (88%)

\* Tempo de adição da gomesina no cultivo.

### 5.1.3. Efeito da gomesina sobre o estágio sexuado de *P. falciparum* no mosquito

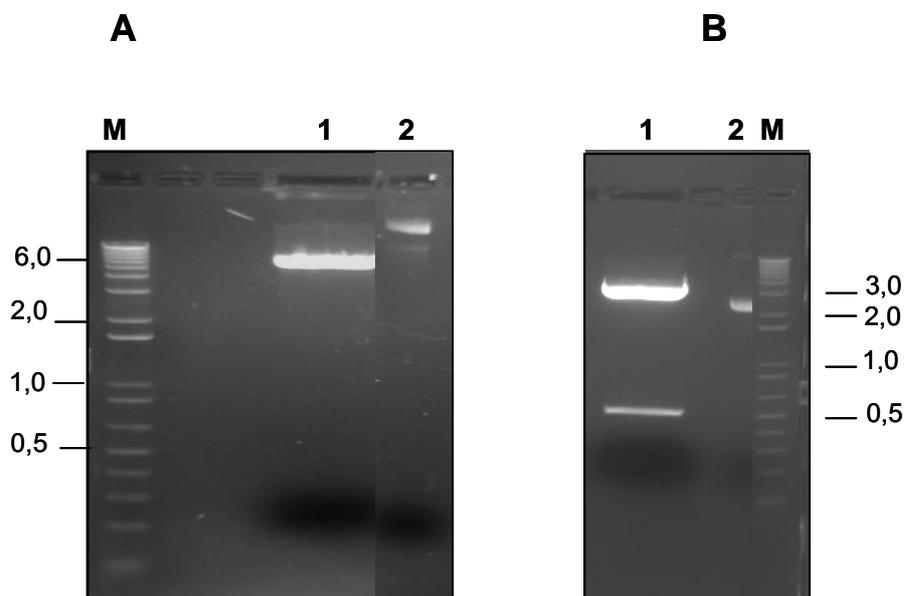
Para testar se a gomesina afetava o desenvolvimento sexuado de *P. falciparum* no mosquito, diferentes concentrações do peptídeo foram adicionadas à cultura de gametócitos. Em 50µM da gomesina, houve uma redução de 56% no número de oocistos, enquanto o bloqueio total foi obtido com 100µM (Tabela 3).

Tabela 3. Inibição da formação de oocistos de *P. falciparum* por gomesina.

Concentração de gomesina	Número de oocistos por intestino médio <sup>a</sup>	Mosquitos positivos para oocistos <sup>b</sup>	% Inibição de oocistos
controle	23±23 (0-99)	78,8 (41/52)	-
25µM	17±21 (0-89)*	63,4 (33/52)	26
50µM	10±12 (0-51)**	71,2 (37/52)	56
100µM	0.5±1,2 (0-5)**	25 (13/52)	99,9
200µM	0**	0 (0/52)	100

a

de cerca de 0,5kb, correspondente ao gene da PLA<sub>2m</sub>, contendo os mesmos sítios *Kpn* I e *Bam*H I, foi excisado do gel (Fig. 6, B) para dar prosseguimento à clonagem no vetor de expressão, pET32a.

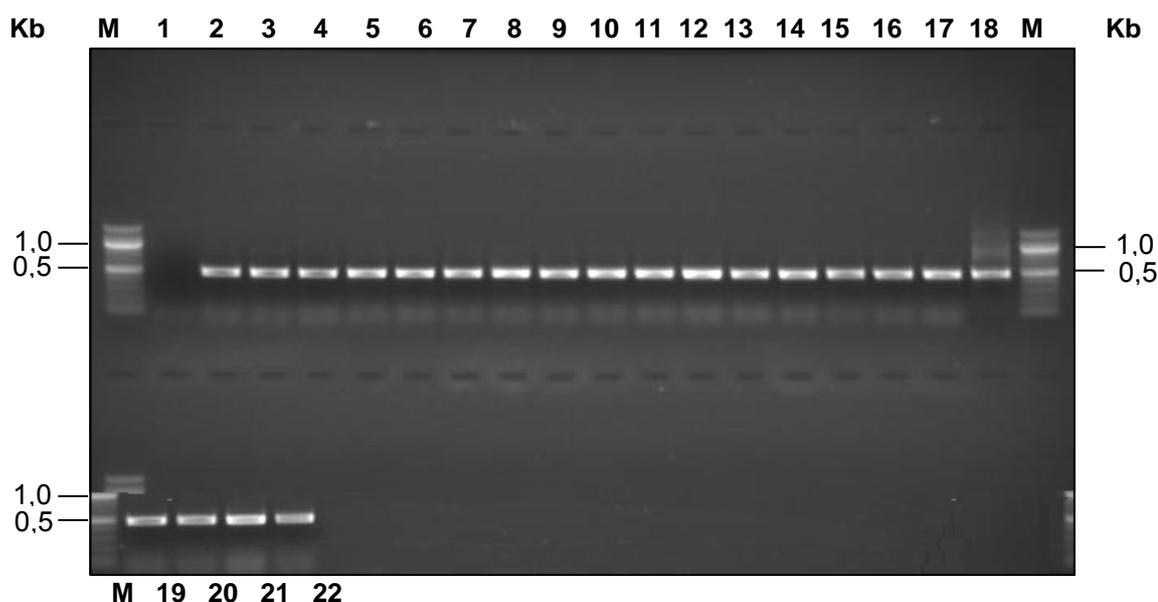


**Figura 6: Digestão dos vetores pET32a e pGemT com as enzimas *Kpn* I e *Bam*H I:** O vetor pET32a (A) e o vetor pGemT (B) foram digeridos seqüencialmente com as enzimas *Kpn* I e *Bam*H I. Os produtos das digestões foram analisados em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio. M: marcador de DNA 1kb plus. 1 e 2: vetor pET32a digerido; 3: não digerido (A); 1: vetor pGemT digerido; 2: vetor não digerido 1 (B).

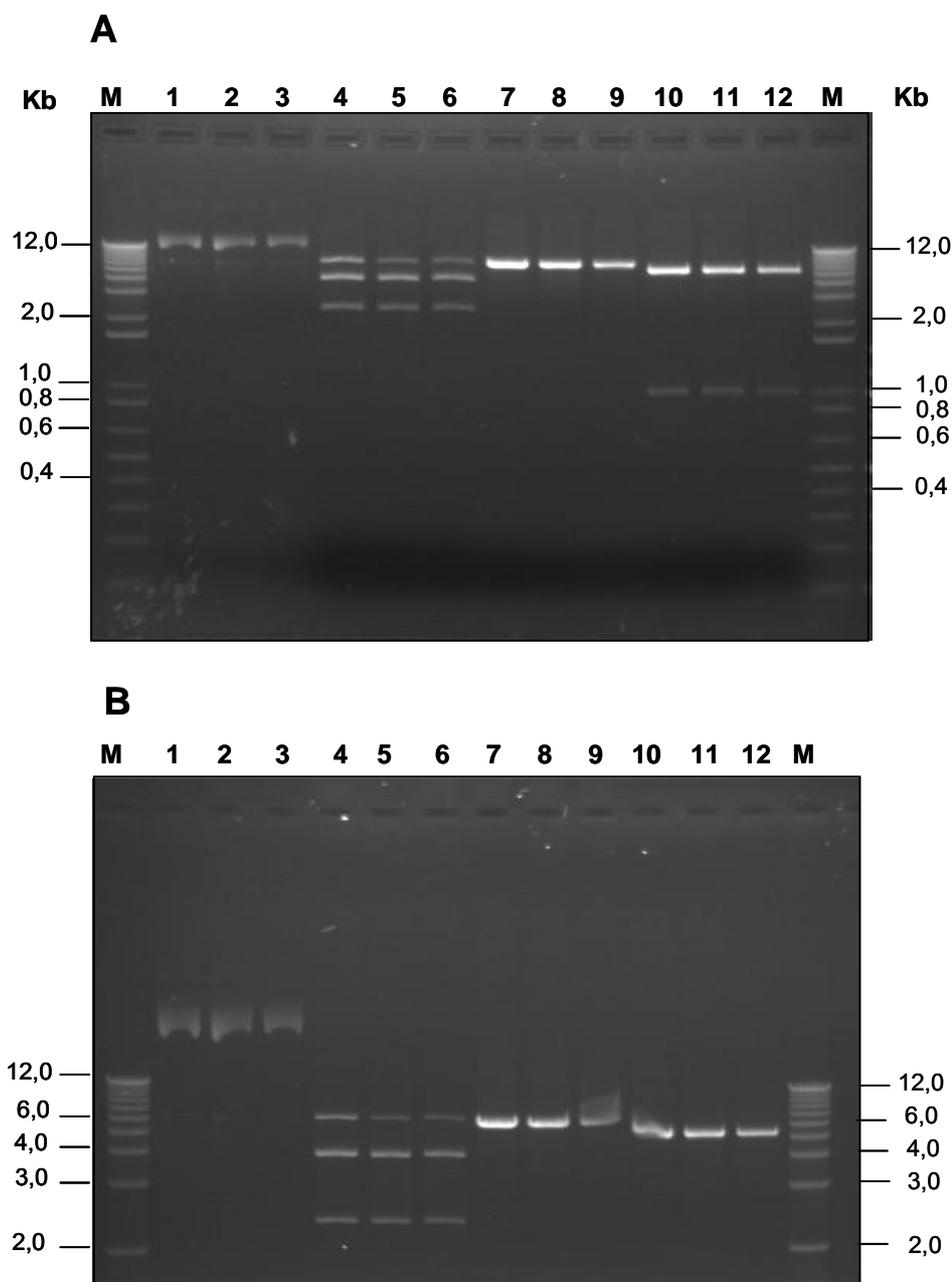
### 5.2.2. Clonagem do gene da PLA<sub>2m</sub> no vetor pET32a

O gene da PLA<sub>2m</sub> foi ligado ao vetor pET32a e, posteriormente usado para transformar bactérias competentes TOP10. A presença do gene da PLA<sub>2m</sub> foi analisada pela PCR de colônias, em gel de agarose corado com brometo de etídio. Dos 20 clones analisados, todos continham o gene da PLA<sub>2m</sub>, mostrando uma alta eficiência no processo de clonagem (Fig. 7). Além disto, para a confirmação, optamos por fazer um mapa de restrição do vetor pET32a com várias enzimas (*Pst* I e *Xba* I, *EcoR* I, *Xba* I e *EcoR* I) para confirmarmos que o gene da PLA<sub>2m</sub> foi inserido corretamente no vetor pET32a (Fig. 8). Na digestão dos clones 8, 12 e 19 com a enzima *Pst* I e *Xba* I, observamos o aparecimento de três fragmentos, ~ 2,4, 4,0, 6,4kb, mas esperávamos o aparecimento de duas bandas (2,4, e 4,0kb), pois o plasmídeo tem um sítio de cada enzima. A banda de ~ 6kb provavelmente é o plasmídeo cortado somente com uma das enzimas (~ 6,4kb esperado) havendo, portanto digestão parcial. Com a enzima *EcoR* I, houve o aparecimento de um

fragmento de aproximadamente 6kb, linearizando o vetor como esperado, pois este apresenta um único sítio para a enzima *EcoR* I em sua estrutura. Com a digestão do vetor com as enzimas *Xba* I e *EcoR* I, podemos verificar o aparecimento de dois fragmentos (5,8kb e 1,0kb), confirmando mais uma vez a inserção do gene da PLA<sub>2</sub>m no plasmídeo.



**Figura 7: PCR de colônias de bactérias para verificar a inserção do gene da PLA<sub>2</sub>m no vetor de expressão pET32a:** Uma alíquota de 5 $\mu$ l dos clones de bactérias transformadas com a ligação do gene da PLA<sub>2</sub>m em pET32a foi adicionada à mistura de reação da PCR. Os produtos obtidos da PCR (com iniciadores específicos para o gene da PLA<sub>2</sub>m) foram analisados em gel de agarose a 1,0 % corado com brometo de etídio. **M:** marcador de DNA 100 pb; 1: controle (-): ausência de DNA, 2 a 22: clones de bactérias transformadas, exceto 18: controle (+) da reação: AgPerPLA<sub>2</sub> em pUC19.



**Figura 8: Mapa de restrição do vetor pET32a contendo o gene da PLA<sub>2</sub>m:** Amostras de DNA plasmidial proveniente de três clones de bactérias foram digeridas com diferentes enzimas de restrição. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose a 1,0 %, corados com brometo de etídio. **M:** marcador de DNA de 1kb. Amostras 1 a 3: vetor (clones 8, 12 e 19) não digerido, 4 a 6 vetor digerido com *Pst* I e *Xba* I, 7 a 9: *EcoR* I, 10 a 12: *Xba* I e *EcoR* I. **(A)** 30 min; **(B)** 1 h de corrida.

---

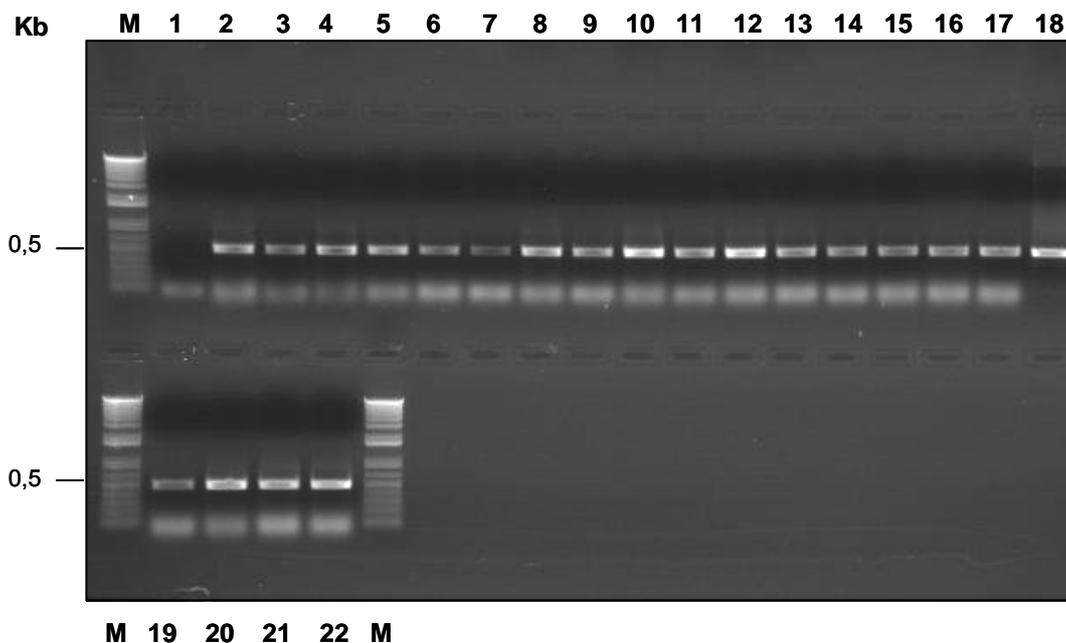
### 5.2.3. Sequenciamento do vetor pET32a contendo o gene da PLA<sub>2</sub>m

Procedemos ao sequenciamento do inserto de um dos clones de bactérias, obtido após a clonagem para checarmos a identidade do fragmento inserido. Pela análise da Figura 9, verificamos duas substituições 130G>A e 145C>A na seqüência de nucleotídeos obtida do clone 8 em relação à seqüência da fosfolipase A<sub>2</sub> não mutada (número de acesso AF438408). Estas modificações de nucleotídeos correspondem às mudanças de aminoácidos no sítio ativo da enzima, A43T e H48N. Os resultados confirmam a presença das mutações inseridas no sítio ativo da enzima PLA<sub>2</sub>m.

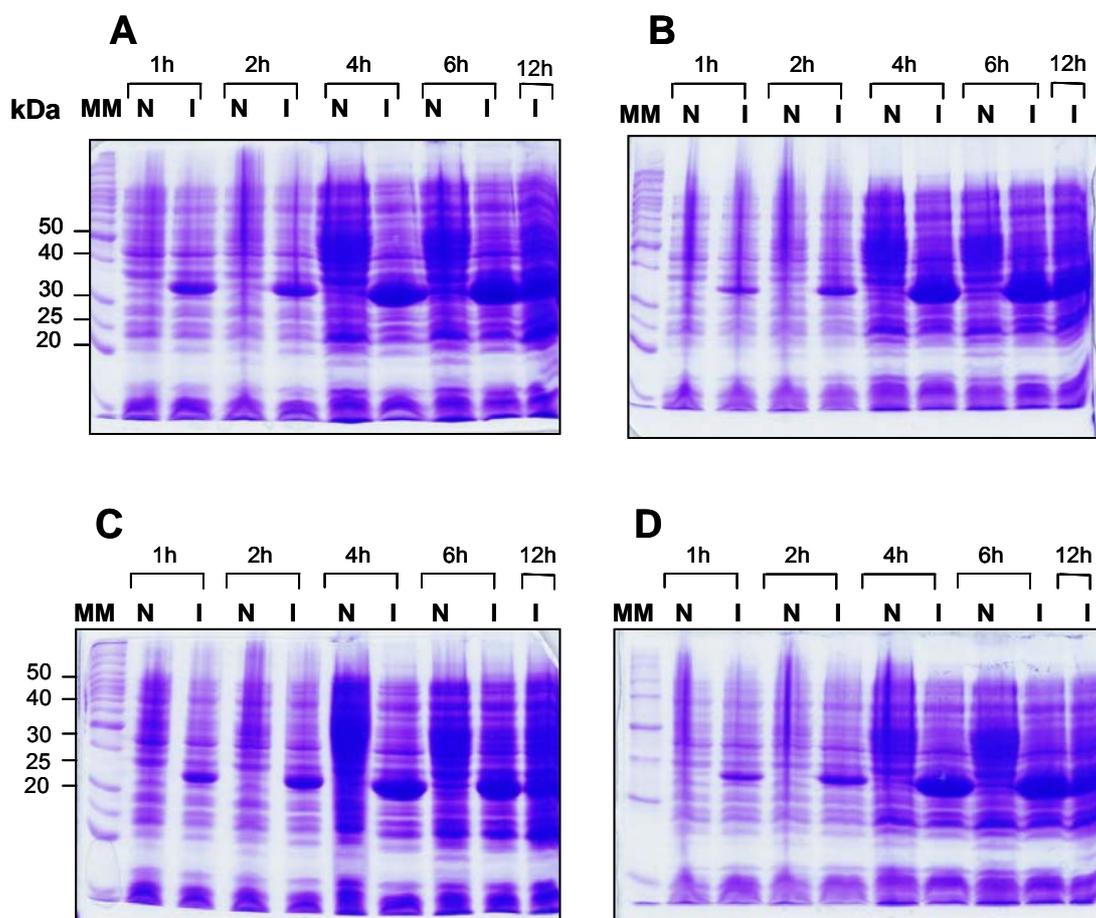


#### 5.2.4. Expressão da proteína PLA<sub>2m</sub> recombinante

O vetor pET32a contendo o gene da PLA<sub>2m</sub> foi inserido por choque térmico em bactérias de expressão BL21(DE3)pLysS. Os clones de bactérias obtidos foram analisados através da PCR (de colônias de bactérias) em gel de agarose corado com brometo de etídio. De acordo com a figura 10 podemos observar que dos 20 clones analisados, o gene da PLA<sub>2m</sub> foi amplificado em todos eles. Desta forma, selecionamos quatro clones de bactérias, cujo gene da PLA<sub>2m</sub> estava presente e induzimos a expressão por 1, 2, 4, 6, 12h com a adição de 1mM de IPTG. Após a indução da expressão, as amostras foram centrifugadas e o sedimento solubilizado em PBS 1x e tampão de amostra. Pela análise em SDS-PAGE, observamos que após a indução por IPTG obtivemos uma banda proeminente de 38kDa correspondente à PLA<sub>2m</sub> recombinante (20kDa do vetor + 18kDa PLA<sub>2m</sub>). Na figura 11, observamos que ocorreu um aumento da expressão da proteína recombinante de 1 a 4h em todas as amostras testadas, enquanto que no intervalo de 6 e 12h a expressão foi mantida. Uma vez que a expressão da PLA<sub>2m</sub> foi verificada em todas as amostras analisadas, selecionamos o clone 2 para análises futuras e fixamos em 4h o tempo de indução com IPTG.



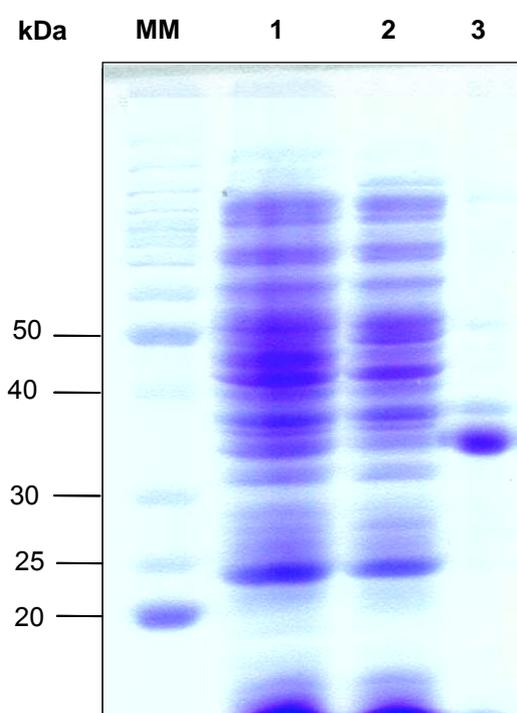
**Figura 10: PCR de colônias de bactérias para verificar inserção do gene da PLA<sub>2</sub>m no vetor de expressão pET32a em bactérias BL21(DE3)pLysS:** Uma alíquota de 5 $\mu$ l dos clones de bactérias transformadas com a ligação do gene da PLA<sub>2</sub>m em pET32a foram adicionados à mistura da reação PCR. Os produtos obtidos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. **M:** marcador de DNA 1kb plus. 1: controle (-): ausência de DNA, 2 a 22: clones de bactérias transformadas, exceto 18: controle (+) da reação.



**Figura 11: Análise em SDS-PAGE a 12% da cinética de expressão da proteína recombinante PLA<sub>2m</sub>:** Quatro clones de bactérias transformadas com o plasmídeo pET32a (contendo o gene da PLA<sub>2m</sub>) foram crescidas em 5ml de meio LB contendo antibióticos por 2h a 37°C, em agitação. Uma alíquota contendo 50µl da cultura de bactérias foi inoculada em 5ml de meio LB contendo antibióticos, sem (N) ou com (I) 1mM de IPTG em diferentes intervalos de incubação (1, 2, 4, 6, 12h). As amostras foram coletadas, centrifugadas, ressuspendidas em PBS e tampão de amostra e aplicadas em gel de poliácridamida. O gel foi corado com Coomassie Blue R. MM: Marcador de massa molecular. Clones 2 (A), 4 (B), 6 (C), 19 (D).

### 5.2.4.1. Localização da PLA<sub>2</sub>m em corpúsculos de inclusão

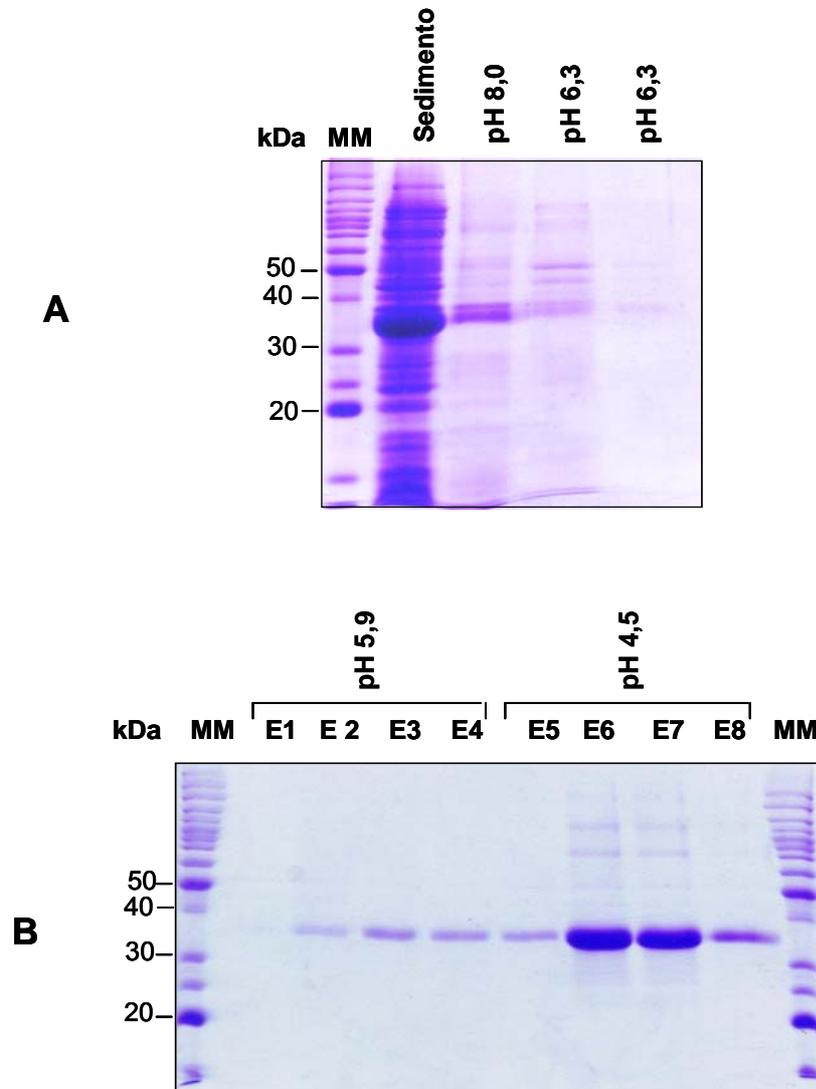
O clone 2 foi inoculado em meio LB contendo ampicilina e cloranfenicol, e a expressão do gene da PLA<sub>2</sub>m induzida pela adição de IPTG. Já que a proteína foi mais expressa 4h após a indução com IPTG, a próxima etapa consistiu em verificar se a PLA<sub>2</sub>m estaria localizada no sobrenadante ou no sedimento. Desta forma, a cultura de bactérias foi lisada e lavada, separando-se as proteínas obtidas do sobrenadante (fração solúvel) e do sedimento (fração insolúvel) após centrifugação. Verificamos que a PLA<sub>2</sub>m estava presente no sedimento bacteriano e não no sobrenadante, sinalizando assim que a proteína PLA<sub>2</sub>m encontrava-se insolúvel, em corpúsculos de inclusão (Fig. 12, canaleta 3).



**Figura 12: Análise em SDS-PAGE a 12% para localizar a expressão da PLA<sub>2</sub>m: MM:** marcador de massa molecular; **1:** cultura de bactérias não induzida; **2:** sobrenadante da cultura induzida; **3:** sedimento da cultura induzida com 1mM IPTG.

#### 5.2.4.2. Purificação da proteína PLA<sub>2m</sub> em coluna de Níquel

Uma vez que a proteína foi expressa no sedimento, tornou-se necessária a solubilização da amostra com agente desnaturante (Uréia 8M) para que pudéssemos purificá-la. O lisado processado foi aplicado em uma coluna de Níquel, equilibrada com diferentes tampões. A proteína PLA<sub>2m</sub> foi eluída em tampões com pHs decrescentes (5,9 e 4,5). Da purificação resultaram-se oito amostras coletadas, que foram analisadas em gel de poliacrilamida (Fig 13). Na figura 13. A, observamos que a proteína recombinante encontra-se no sedimento, não sendo detectada nos tampões de homogeneização da amostra [(B), pH 8,0] e lavagem [(C), pH 6,3] após a passagem pela resina. A proteína começou a ser eluída no pH 5,9, sendo que no pH 4,5 houve um incremento na eluição, que resultou em um aumento da concentração protéica verificada no gel (Fig. 13, B). Pela análise em SDS-PAGE, podemos verificar que a banda corresponde à proteína recombinante PLA<sub>2m</sub>, apresentando uma massa molecular em torno de 38kDa sendo 19kDa da proteína de fusão (Tioredoxina), 1kDa da cauda de 6 histidinas e 18kDa da proteína de interesse.



**Figura 13: Análise em SDS-PAGE a 12% das frações obtidas da purificação da proteína recombinante PLA<sub>2m</sub>:** O sedimento obtido da cultura de bactérias expressando a proteína PLA<sub>2m</sub> foi lisado e aplicado em uma coluna de Níquel (Ni<sup>2+</sup> -NTA). As frações obtidas do processo de lavagem (pH 8,0 e 6,3) (**A**) e eluição (pH 5,9 e 4,5) (**B**) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. O gel foi corado com Coomassie Blue R. **MM**: marcador de massa molecular. **E1 até E8**: frações eluídas.

### 5.2.5. Atividade da proteína PLA<sub>2m</sub> recombinante sobre o desenvolvimento de *P. gallinaceum*

Para testar o efeito da proteína recombinante sobre o desenvolvimento do parasita, cerca de 0,1 $\mu$ mol/l da PLA<sub>2m</sub> foram adicionados ao sangue obtido de aves infectadas com cepa de *P. gallinaceum* e utilizado para alimentação de mosquitos (fêmeas) *Aedes fluviatilis*, em um sistema de alimentação artificial. Como controles foram utilizados, tampão onde a proteína foi dialisada (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris, 0,5M Uréia, pH 6,9) e 0,1 $\mu$ mol/l da proteína PLA<sub>2</sub> comercial [capaz de inibir o desenvolvimento do parasita como demonstrado por Zieler *et al.* (2001)]. Podemos observar, na tabela 4, que a PLA<sub>2m</sub> recombinante foi capaz de inibir, o desenvolvimento de *P. gallinaceum* de 70 a 78,6%, quando comparada ao controle (tampão), ao nível de significância menor que 1% pelo mesmo Teste estatístico (Mann Whitney). Como esperado, a proteína PLA<sub>2</sub> (comercial) demonstrou uma capacidade de inibição do desenvolvimento do parasita de 91 a 93%, quando comparado ao controle ( $p < 0,01$ ). Em outro experimento, observamos que embora a prevalência de mosquitos infectados foi menor do que 70%, a inibição do desenvolvimento de *P. gallinaceum* foi de 43,3% para a PLA<sub>2m</sub> e 92,2% para a PLA<sub>2</sub> (dados não mostrados na tabela). Os resultados são provenientes de três experimentos independentes.

Tabela 4: Efeito da PLA<sub>2</sub>m recombinante sobre a formação de oocistos de *P. gallinaceum*.

Exp.	Amostra	Prevalência de infecção <sup>a</sup>	Número de oocistos (faixa) <sup>b</sup>	Média do n <sup>o</sup> . de oocistos <sup>c</sup>	Inibição
1	Tampão	74% (20/27)	(0 - 122)	32,4	-
	PLA <sub>2</sub> m	67% (12/28)	(0 - 72)	10,7	70%
	PLA <sub>2</sub>	40% (8/20)	(0 - 21)	2,8	91%
2	Tampão	90% (18/20)	(0 - 120)	21,3	-
	PLA <sub>2</sub> m	40% (8/20)	(0 - 34)	4,55	76,8%
	PLA <sub>2</sub>	15% (3/20)	(0 - 2)	0,2	93%

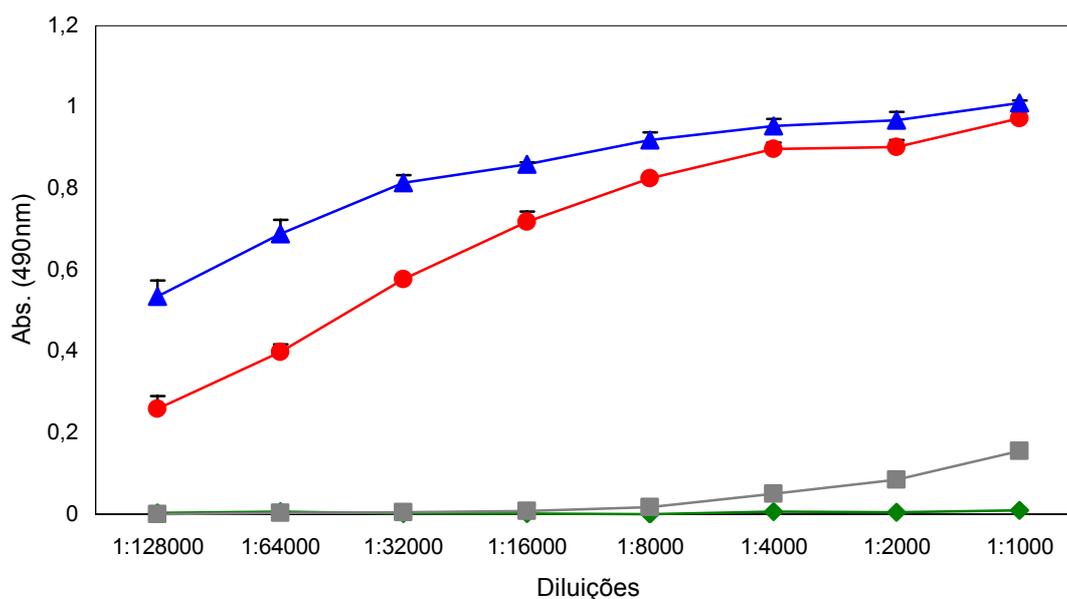
<sup>a</sup> Porcentagem de mosquitos infectados (número de mosquitos infectados/número total de mosquitos).

<sup>b</sup> Número de oocistos entre parêntese.

<sup>c</sup> Média do número de oocistos por intestino. Os valores observados estão indicados entre parêntese. As médias de oocistos dos mosquitos alimentados com sangue + tampão e alimentados com sangue + amostras testadas foram comparadas pelo Teste Mann Whitney (com diferença significativa ao nível de 1%).

### 5.2.6. Produção de anticorpos policlonais contra PLA<sub>2</sub>m

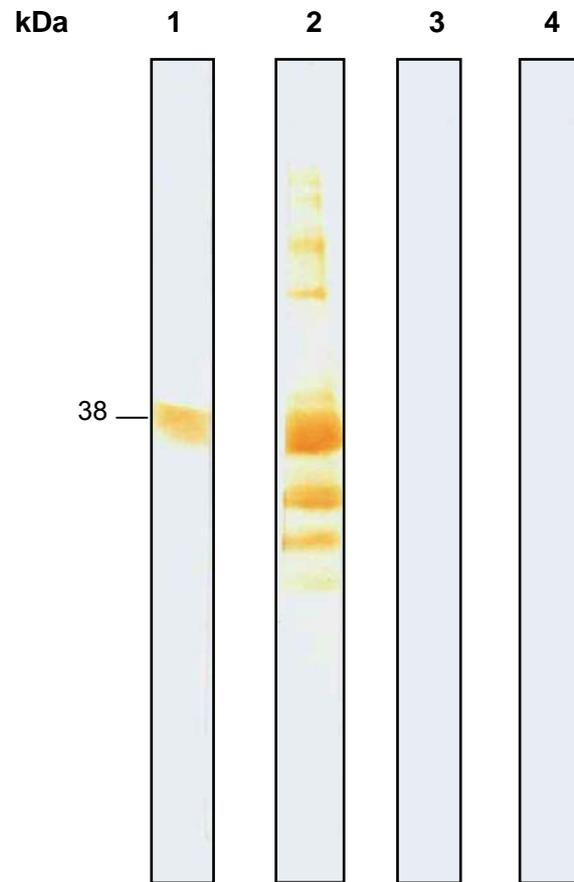
Para verificar a presença da proteína no intestino de mosquitos transgênicos, nós produzimos em coelhos anticorpos policlonais mono-específicos contra a proteína PLA<sub>2</sub>m recombinante. Amostras de soros coletadas antes e após a imunização dos animais foram tituladas por ELISA, em diluições seriadas (Fig. 14). Observamos que os soros policlonais 1 e 2 foram capazes de reconhecer eficientemente a proteína recombinante em todas as diluições testadas (1:1000 até 1:128.000).



**Figura 14: Titulação dos soros policlonais contra PLA<sub>2</sub>m:** Uma placa de 96 poços foi sensibilizada com 5µg/ml da PLA<sub>2</sub>m recombinante, bloqueada com leite 5%, lavada com PBST e incubada com os soros pré- imune 1 ( ) e 2 ( ), policlonal mono-específico 1 ( ) e 2 ( ) em diluições seriadas (fator 2 de diluição), a partir das amostras iniciais diluídas 1000 vezes. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. A reação foi revelada pelo sistema peroxidase/peróxido de hidrogênio. Os valores representam a média ± desvio padrão de triplicata.

### 5.2.7. Reconhecimento da PLA<sub>2</sub>m pelos anticorpos policlonais

Para testar a imunogenicidade dos anticorpos produzidos, cerca de 15µg da proteína foi submetida à eletroforese, transferida para membrana de nitrocelulose e o reconhecimento pelos anticorpos analisados por Immunoblotting. A figura 15 mostra que o soro 1 contendo anticorpos policlonais contra PLA<sub>2</sub>m foi capaz de reconhecer uma banda protéica de 38kDa que corresponde à proteína recombinante, no entanto o soro policlonal 2 foi capaz de reconhecer além da PLA<sub>2</sub>m outras bandas protéicas inespecíficas, na diluição de 1:10.000. Como esperado não houve reconhecimento de bandas protéicas pelos soros pré-imune 1 e 2.

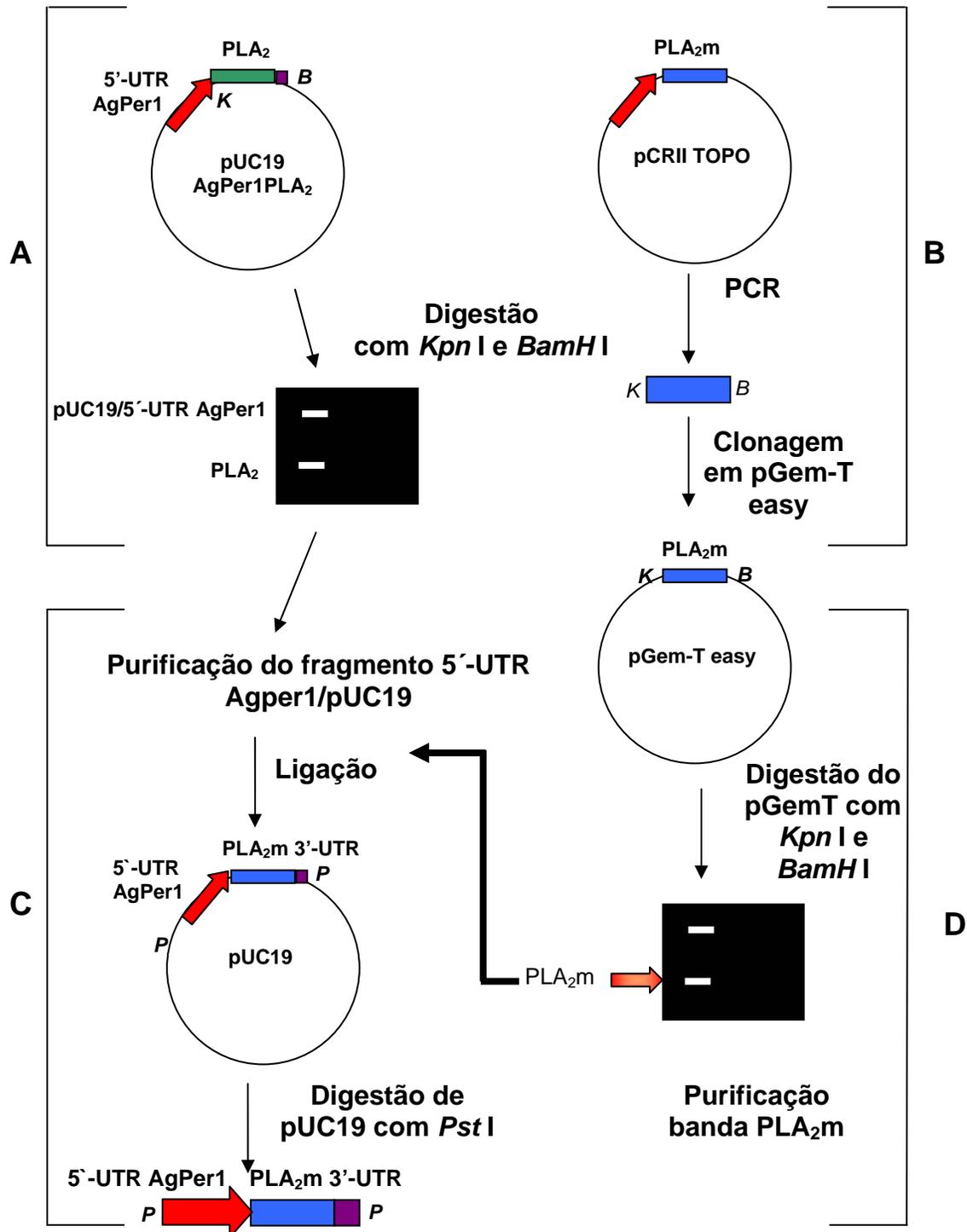


**Figura 15: Análise em imunoblotting do reconhecimento da PLA<sub>2</sub>m pelo anticorpo policlonal mono-específico contra a proteína recombinante:** As membranas foram tratadas com soro policlonal contra a PLA<sub>2</sub>m do coelho 1 (1) e do coelho 2 (2) ou com os soros pré-imune do coelho 1 (3) e do coelho 2 (4). Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de coelho. A reação foi revelada pelo sistema peroxidase/peróxido de hidrogênio.

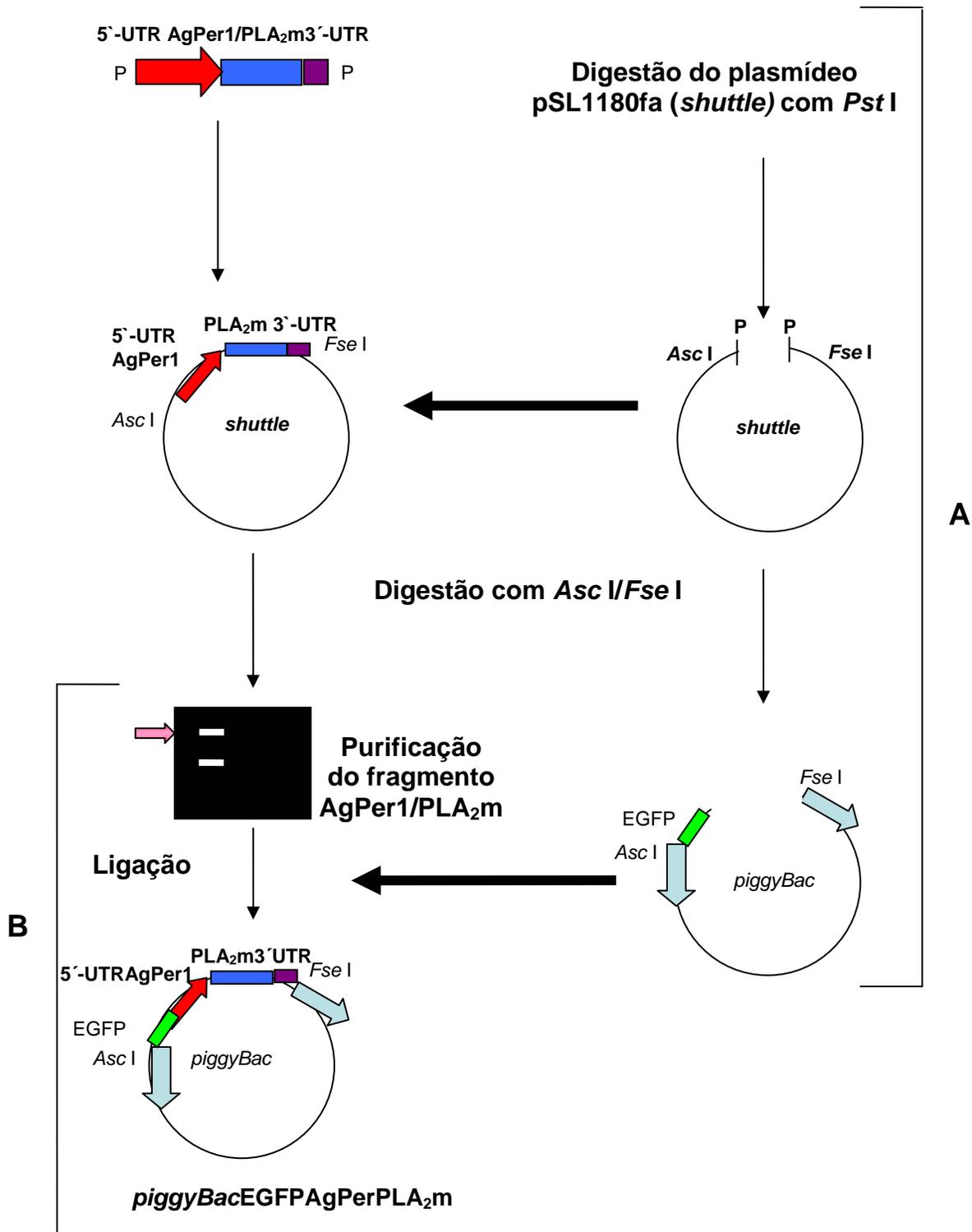
---

### 5.3. MONTAGEM DO GENE HÍBRIDO AgPer1PLA<sub>2</sub>m NO VETOR *piggyBacEGFP*

Iniciamos o processo de construção do gene híbrido a partir de dois plasmídeos cedidos pelo nosso colaborador, Dr. Marcelo Jacobs-Lorena (Universidade Johns Hopkins, EUA). O primeiro plasmídeo (pUC19 - AgPer1PLA<sub>2</sub>) continha a região promotora da proteína 1 da matriz peritrófica de *Anopheles gambiae* (AgPer1) e a região codificadora da PLA<sub>2</sub> do veneno de abelha original (Abraham *et al.*, 2005). O segundo plasmídeo (pCRII TOPO PLA<sub>2</sub>m) continha a seqüência da PLA<sub>2</sub> mutada em seu sítio ativo e conseqüentemente inativada (ver Fig. 3). A seguir descreveremos várias subclonagens em plasmídeos que possuem sítios de enzimas de restrição necessários para a etapa final de inserção no vetor que contém as seqüências do elemento de transposição *piggyBacEGFP* (esquematizados na Metodologia - Figs. 16 e 17).



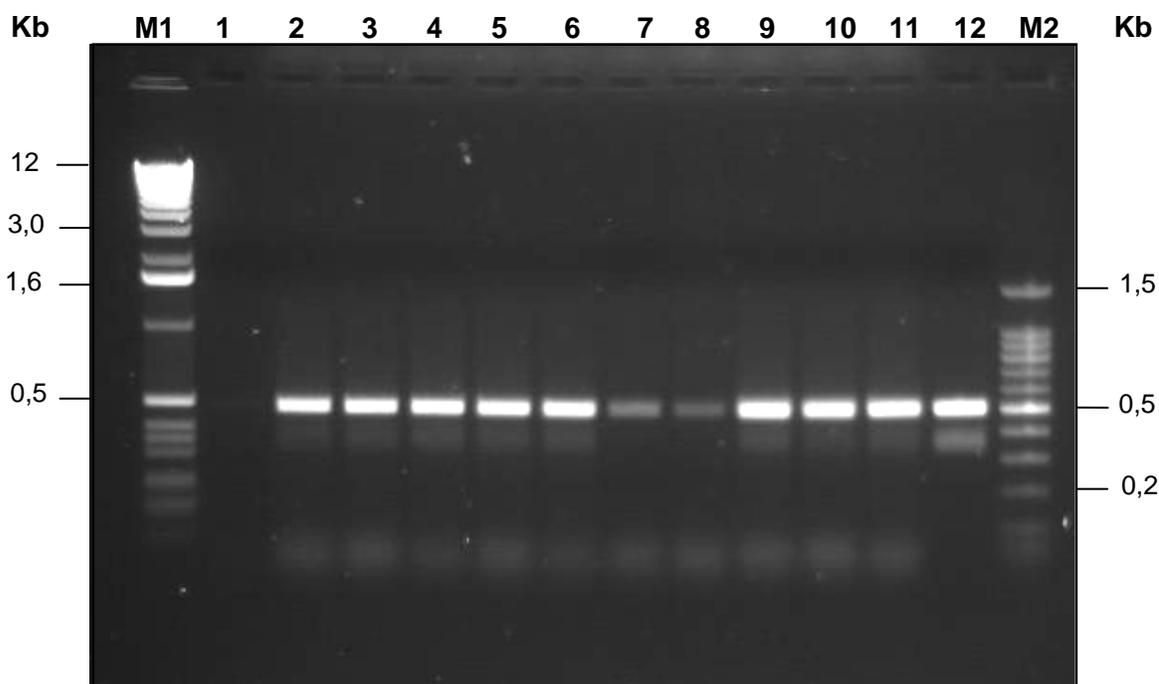
**Figura 16: Esquema mostrando a obtenção do plasmídeo pUC19, contendo o cassete AgPer1PLA<sub>2</sub>m:** As 1<sup>as</sup> etapas incluem a digestão do plasmídeo pUC19 (para retirada da PLA<sub>2</sub>) (A), amplificação da PLA<sub>2</sub>m com iniciadores contendo sítios *Kpn*I e *Bam*HI e a purificação do promotor AgPer1 em pUC19(C). As próximas etapas incluem: clonagem da PLA<sub>2</sub>m em pGem-T easy (B), digestão deste vetor para retirada do inserto (PLA<sub>2</sub>m) e ligação do cassete AgPer1PLA<sub>2</sub>m em pUC19 (D). Os tamanhos dos fragmentos apresentados no esquema não estão em escala.



**Figura 17:** Esquema mostrando a 2ª etapa até a obtenção do plasmídeo *piggyBacEGFP* contendo o cassete *AgPer1PLA<sub>2</sub>m* para ser utilizado na microinjeção de embriões de *Ae. fluviatilis*: A 1ª etapa inclui a digestão do plasmídeo pSLfa1180fa (*shuttle*) com *Pst* I, a inserção do cassete *AgPer1PLA<sub>2</sub>m* e depois a digestão deste plasmídeo e do *piggyBac* com as enzimas *Asc* I e *Fse* I (A). A próxima etapa inclui a excisão do fragmento *AgPer1/PLA<sub>2</sub>m*, purificação e ligação no vetor *piggyBac* (B). As setas no vetor *piggyBac* correspondem aos braços do elemento de transposição. Os tamanhos dos fragmentos apresentados no esquema não estão em escala.

### 5.3.1. Subclonagem da PLA<sub>2</sub>m em pGem-T easy

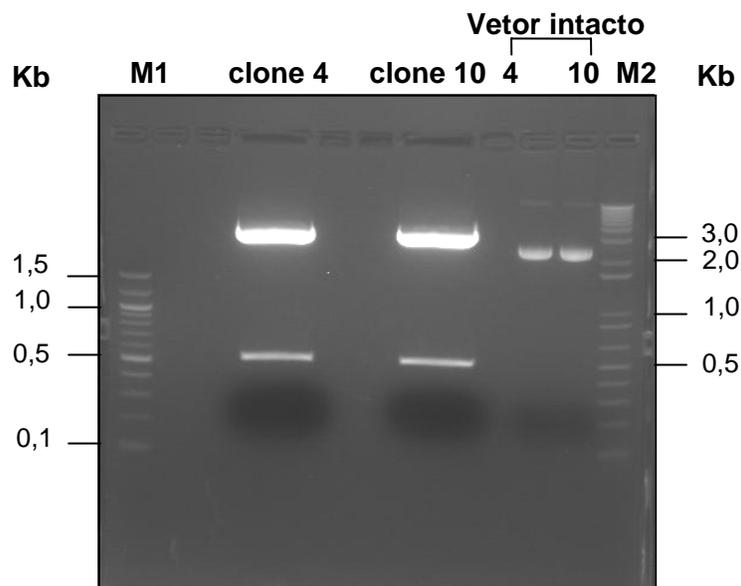
O plasmídeo pCR II TOPO PLA<sub>2</sub>m foi utilizado para transformar células de *E. coli* competentes TOP10 e seu DNA plasmidial foi purificado. O DNA plasmidial foi utilizado para amplificação da PLA<sub>2</sub>m por PCR, inserindo-se artificialmente os sítios das enzimas de restrição *Kpn* I e *Bam*H I nas extremidades do fragmento, necessários para a clonagem deste fragmento em substituição à PLA<sub>2</sub> original no plasmídeo pUC19 - AgPer1. O produto desta PCR foi clonado no plasmídeo TA pGem-T easy, e utilizado para transformar células TOP10 competentes e posteriormente, alguns clones da placa foram checados por PCR de colônia. Em todos os 10 clones analisados, houve a amplificação do gene da PLA<sub>2</sub>, correspondente ao fragmento de cerca de 0,5kb (Fig. 18).



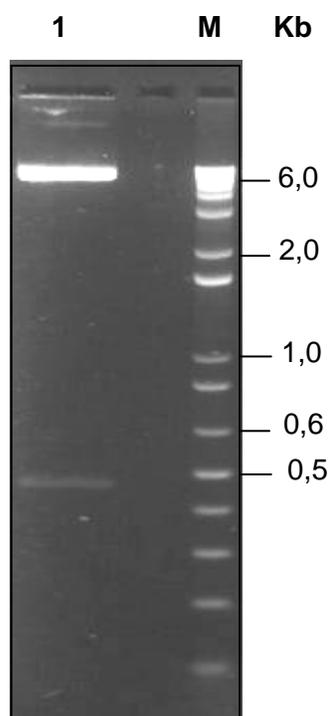
**Figura 18: PCR de colônias para verificar a clonagem do gene da PLA<sub>2</sub>m em pGem-T easy: M1:** Marcador de DNA 1kb; **M2:** Marcador de DNA 100pb, 1: controle (-) ausência de DNA, 2 a 11: clones de bactérias transformadas, 12: controle (+): PLA<sub>2</sub>m em pUC19.

### 5.3.2. Digestão dos plasmídeos pGem-T e pUC19

Ambos os plasmídeos (pGem-T easy/PLA<sub>2</sub>mutada e pUC19/AgPer1PLA<sub>2</sub>) foram digeridos sequencialmente, com as enzimas *Kpn* I/*Bam*H I. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. As bandas correspondentes à PLA<sub>2</sub>m (do plasmídeo pGem-T easy - PLA<sub>2</sub>m) e do plasmídeo pUC19 contendo as seqüências regulatórias da AgPer1 foram excisadas do gel e os respectivos DNAs purificados utilizando o kit QiaexII (Qiagen). Na figura 19, observamos que após a digestão do plasmídeo pGem-T easy houve o aparecimento de dois fragmentos, um de 3kb, correspondente ao vetor, e o outro de 0,5kb correspondente à PLA<sub>2</sub>m. A digestão do vetor pUC19 resultou no aparecimento de dois fragmentos, neste caso, um fragmento correspondente ao gene da PLA<sub>2</sub> sem a mutação, de 0,5kb, e o fragmento correspondente ao vetor juntamente às seqüências regulatórias da AgPer1, de 6,1kb (Fig. 20). Posteriormente, o plasmídeo foi desfosforilado com a enzima CIAP.



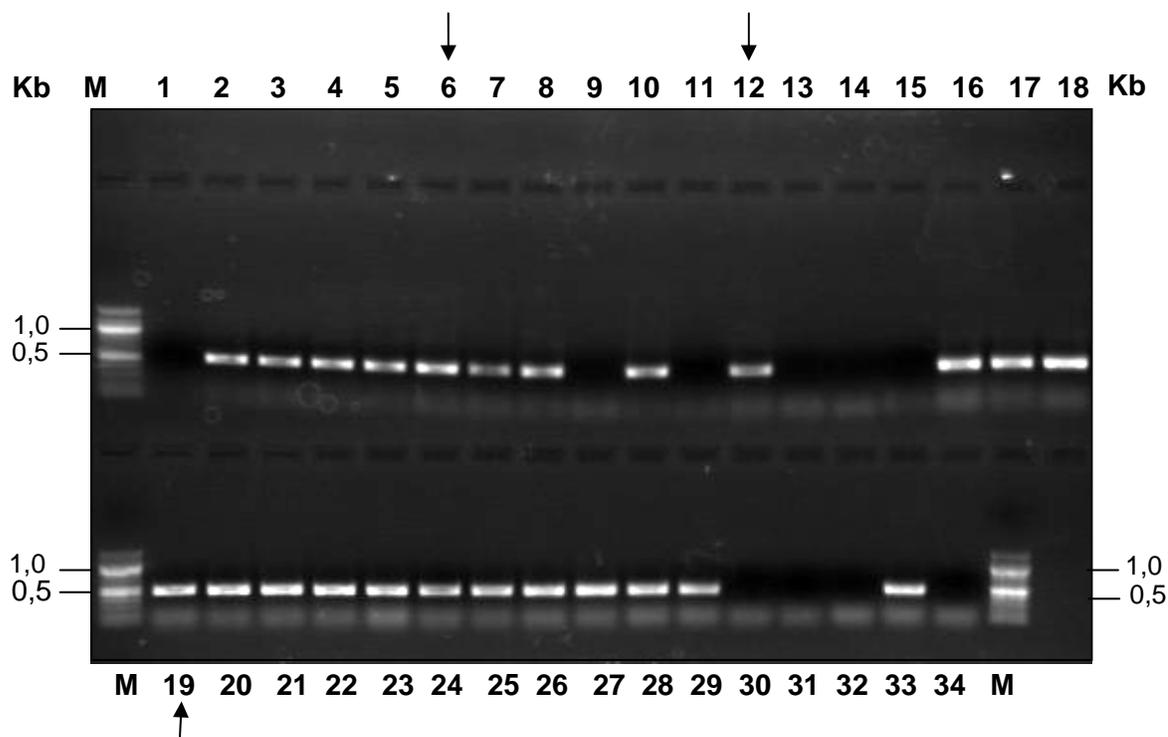
**Figura 19: Digestão de dois clones de bactérias transformadas com o gene da PLA<sub>2</sub>m em pGem-T easy com as enzimas *Kpn* I e *Bam*H I:** Os clones 4 e 10 foram digeridos sequencialmente com as enzimas *Kpn* I e *Bam*H I. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. **M1:** marcador de DNA 100pb; **M2:** marcador de DNA 1kb plus.



**Figura 20: Digestão do plasmídeo pUC19 com as enzimas *Kpn* I e *Bam*H I:** O plasmídeo pUC19 foi digerido seqüencialmente com as enzimas *Kpn* I e *Bam*H I e tratado com a enzima CIAP. O produto foi analisado em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio. **M:** marcador de DNA 1kb plus; **1:** pUC19 digerido e defosforilado.

### 5.3.3. Inserção da PLA<sub>2</sub>m no plasmídeo pUC19

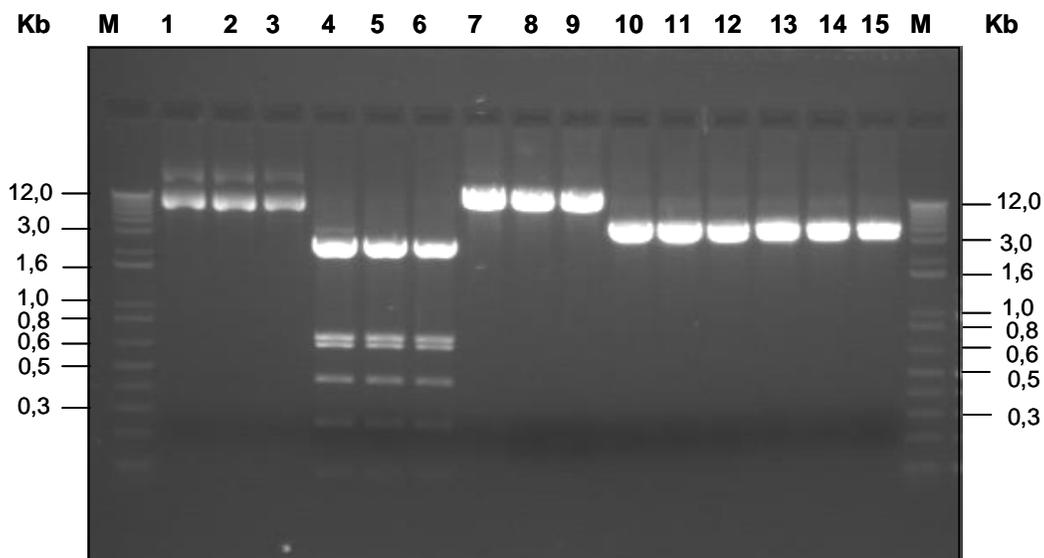
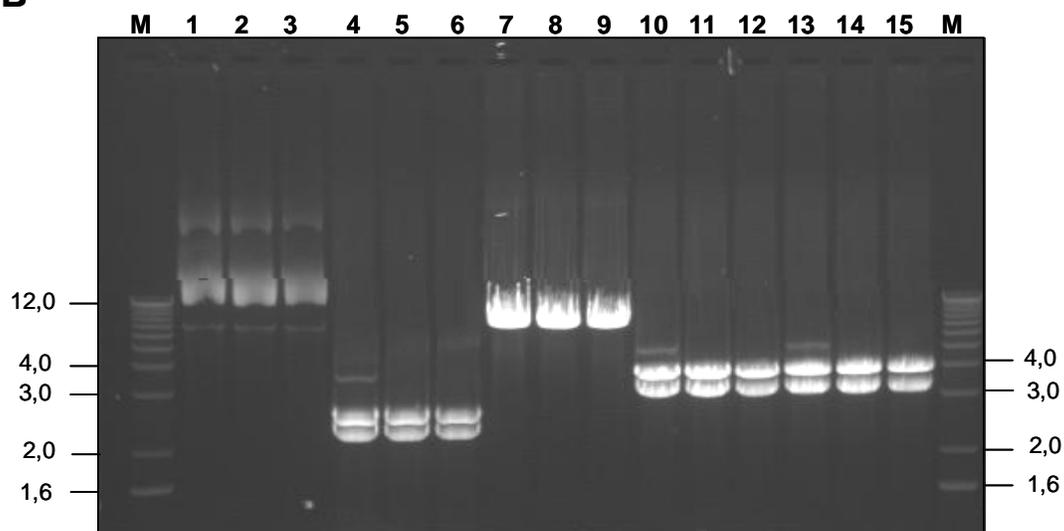
Uma vez que dispúnhamos do plasmídeo pUC19 contendo o promotor AgPer1 e o gene da PLA<sub>2</sub>m purificados, realizamos a ligação destes fragmentos e a transformação de bactérias. Os clones obtidos foram submetidos à PCR de colônia utilizando iniciadores específicos para a PLA<sub>2</sub>m (PLAMF e PLAMR), e os produtos analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. De 33 clones analisados em 24 clones o gene da PLA<sub>2</sub>m foi amplificado, correspondendo ao fragmento de 0,5kb, observado nas canaletas 2 a 8, 10, 12, 16 a 18, 19 a 29, 33 (Fig. 21).



**Figura 21: Amplificação através da PCR do gene da PLA<sub>2m</sub> ligado ao promotor AgPer1 no plasmídeo pUC19:** Uma alíquota de 5µl dos clones de bactérias transformadas com o gene AgPer1PLA<sub>2m</sub> em pUC19 foram adicionados a uma reação de PCR. Os produtos obtidos da amplificação foram analisados em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio. **M:** marcador de DNA 100pb; 1: controle (-): ausência de DNA, 2 a 34: clones de bactérias transformadas. Os clones selecionados estão marcados com uma seta.

#### 5.3.4. Mapa de Restrição do plasmídeo pUC19 contendo o cassete AgPer1PLA<sub>2m</sub>

Para confirmarmos a presença do gene da PLA<sub>2m</sub> neste plasmídeo, cerca de 300ng de DNA do plasmídeo pUC19 (clones 6, 12 e 19) foram digeridos com várias enzimas de restrição (ver mapa do plasmídeo em anexo). Na digestão do vetor com as enzimas *EcoR* I e *Hind* III, houve o aparecimento de fragmentos de tamanhos esperados de acordo com os sítios de restrição presentes no plasmídeo (Fig. 22). Quando a digestão foi realizada com a enzima *Xba* I o plasmídeo foi linearizado, observando-se o aparecimento de um fragmento de 6,4kb, enquanto que na digestão com *Pst* I houve o aparecimento de dois fragmentos predominantes, de 3,0 e de 3,4kb. Desta forma, confirmamos, por meio da digestão do plasmídeo, que o gene da PLA<sub>2m</sub> foi incorporado, junto ao promotor AgPer1 no plasmídeo pUC19.

**A****B**

**Figura 22: Mapa de restrição dos clones de bactérias transformadas com o gene AgPer1PLA<sub>2</sub>m em pUC19:** Os clones 6, 12 e 19 foram digeridos com diferentes enzimas de restrição. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio. **M:** marcador de DNA de 1kb plus. Amostras 1 a 3: vetor (clones 6, 12 e 19) não digerido, 4 a 6: vetor digerido com *EcoRI* e *Hind III*, 7 a 9: *XbaI* e canaletas 10 a 15: *Pst I*. (A) 30 min; (B) 1h de corrida.

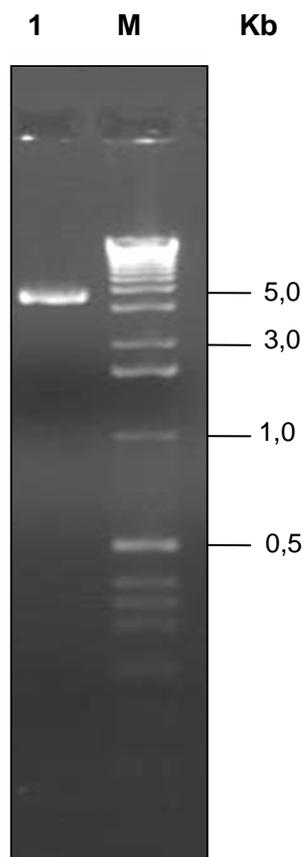
### **5.3.5. Sequenciamento de clones AgPer1PLA<sub>2</sub>m / pUC19**

Nosso próximo passo foi verificar se a seqüência do gene da PLA<sub>2</sub> presente em nossa construção realmente tratava-se do gene da PLA<sub>2</sub> com a mutação nas posições corretas. Para isso, uma amostra de DNA correspondente ao clone 6 (AgPer1PLA<sub>2</sub>m em pUC19) foi sequenciada. De acordo com a análise da seqüência obtida verificamos que o clone 6 apresenta de fato, o gene da PLA<sub>2</sub> com as mutações já descritas anteriormente (Fig. 23).

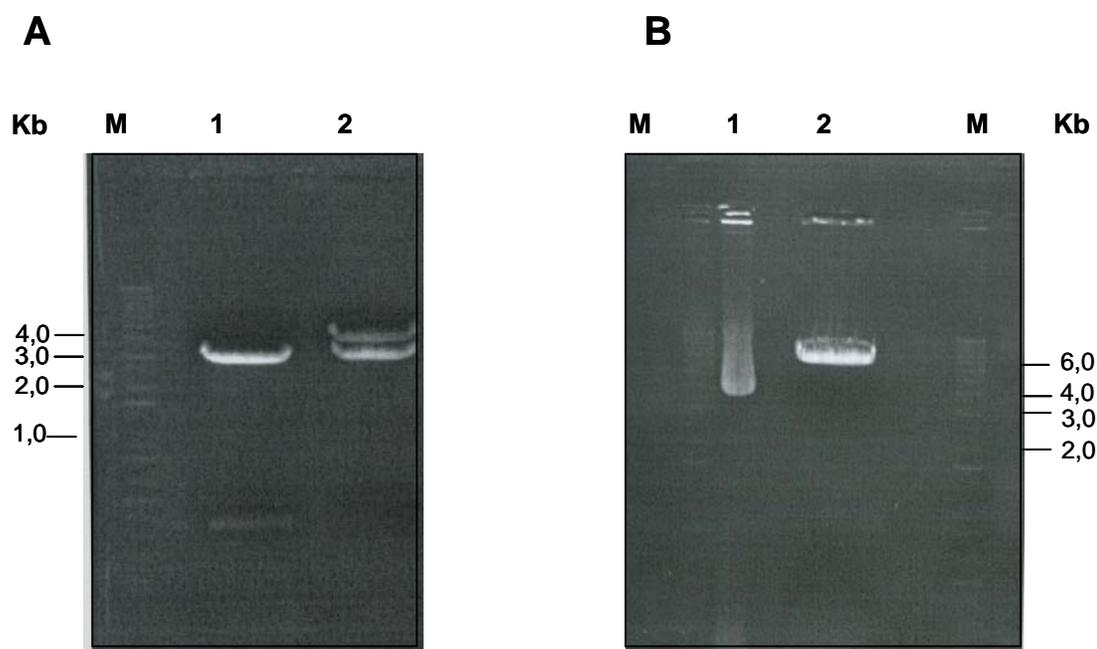


### 5.3.6. Transferência do cassete AgPer1PLA<sub>2</sub>m para o plasmídeo *shuttle*

Depois de verificada a correta seqüência dos clones foi realizada a digestão com a enzima *Pst* I, que tem sítios em ambas as extremidades do cassete (AgPer1PLA<sub>2</sub>m) para posterior transferência para o plasmídeo *shuttle* (pSLfa1180fa). Este plasmídeo possui os sítios para as enzimas de restrição *Asc* I e *Fse* I, necessários para a clonagem final do gene híbrido no transposon, *piggyBac*. O plasmídeo *shuttle* também foi digerido com a enzima *Pst* I (Fig. 24) e posteriormente seu DNA foi tratado com a enzima CIAP para desfosforilar o vetor e evitar seu anelamento (sem ligação ao fragmento de interesse). Após utilização do kit PCR purification (Qiagen) para eliminar todos os resíduos das enzimas, o DNA foi utilizado na reação de ligação. O produto da ligação, unindo o plasmídeo *shuttle* ao cassete AgPer1PLA<sub>2</sub>m, foi clonado em bactérias, e dois clones obtidos (12 e 19) foram digeridos com *Asc* I e *Fse* I; para retirar o fragmento de 3,9kb correspondente ao cassete AgPer1PLA<sub>2</sub>m, flanqueados pelos sítios *Asc* I/*Fse* I. De dois clones digeridos, o clone 12, não incorporou o cassete, pois da digestão resultou o aparecimento de dois fragmentos, de 3,5 e de 0,5kb correspondente aos sítios *Asc* I e *Fse* I presentes no vetor intacto (Fig. 25, A. 1). Já a digestão do clone 19 resultou no aparecimento de dois fragmentos, de 3,5 e de 3,9kb, confirmando a presença do gene de interesse (AgPer1PLA<sub>2</sub>m) (Fig. 25, A. 2).



**Figura 24: Plasmídeo *shuttle* digerido com a enzima *Pst* I:** O plasmídeo *shuttle* foi digerido com a enzima *Pst* I e posteriormente defosforilado. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. **M:** marcador de DNA 1kb. **1:** plasmídeo digerido.



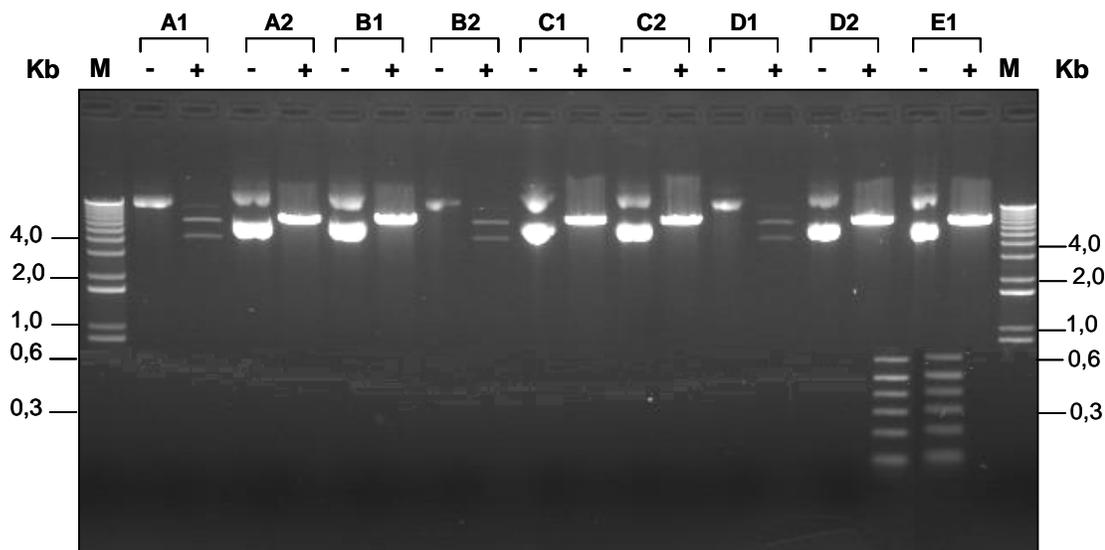
**Figura 25: Digestão dos plasmídeos *shuttle* e *piggyBac* com as enzimas *Asc* I e *Fse* I:** Os vetores *shuttle* (A) e *piggyBac* (B) foram digeridos com as enzimas *Asc* I e *Fse* I. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. **M:** marcador de DNA 1kb plus. (A) Canaletas 1 e 2: clones 12 e 19, vetor *shuttle* digerido com ambas enzimas. (B) 1: vetor *piggyBac* não digerido, 2: vetor digerido com ambas enzimas.

### 5.3.7. Clonagem do gene híbrido AgPer1PLA<sub>2</sub>m em *piggyBac*

Já que o gene da PLA<sub>2</sub>m seria utilizado para ser introduzido em embriões de mosquitos, necessitávamos introduzi-lo no vetor contendo as seqüências do elemento de transposição *piggyBac* e o gene da proteína verde fluorescente (GFP), utilizado como marcador. Cerca de 1 µg do vetor foi digerido com as enzimas *Asc* I e *Fse* I, para que o cassete AgPer1PLA<sub>2</sub> pudesse ser incorporado a este vetor. A digestão resultou no aparecimento de um único fragmento de 6,5kb, correspondente ao vetor linearizado, pois os sítios das enzimas *Asc* I e *Fse* I se encontram bem próximos (Fig. 25, B). Procedemos então à ligação do cassete AgPer1PLA<sub>2</sub> no vetor *piggyBac* e posteriormente, a transformação de bactérias competentes. Vários clones foram obtidos, alguns deles foram selecionamos e denominados, A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2, E1.

### 5.3.8. Mapa de Restrição do vetor *piggyBac*/AgPer1PLA<sub>2</sub>m

Para confirmar se a seqüência foi incorporada digerimos os mesmos clones com as enzimas *Fse* I e *Asc* I. Observamos que somente os clones A1, B2, D1 apresentaram as bandas de 4,2 e 6,5kb (Fig. 26), confirmando a presença da seqüência AgPer1PLA<sub>2</sub>. Nas demais amostras digeridas, não houve o aparecimento das bandas esperadas, podendo ser devido à concentração de enzima utilizada que não foi suficiente para a digestão completa do vetor ou realmente nos outros clones a seqüência não foi introduzida no *piggyBac*. Mas como precisávamos de apenas um clone correto, escolhemos o clone A1 para prosseguirmos o trabalho.

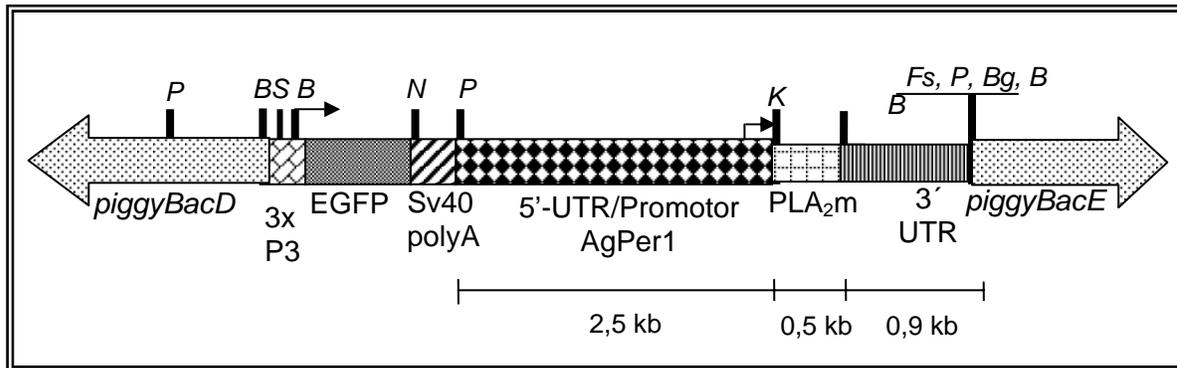


**Figura 26: Digestão do DNA com as enzimas *Asc* I e *Fse* I de diferentes clones de bactérias transformadas com o vetor *piggyBac* contendo o gene AgPer1PLA<sub>2</sub>m:** Os clones de bactérias transformadas com o vetor *piggyBac* contendo o gene híbrido denominados, A1, A2; B1, B2; C1, C2; D1, D2, E1 foram digeridos com as enzimas *Asc* I e *Fse* I. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. **M:** marcador de DNA 1kb plus. (-): clones não digeridos; (+): clones digeridos com ambas as enzimas.

### 5.3.9. Sequenciamento do clone AgPer1PLA<sub>2</sub>m/*piggyBac*

Nosso próximo passo foi verificar se a seqüência do gene da PLA<sub>2</sub> presente em nossa construção realmente se tratava do gene da PLA<sub>2</sub> com a mutação nas posições corretas. Para isso, uma amostra de DNA correspondente ao clone A1 (AgPer1PLA<sub>2</sub> em *piggyBac*) foi seqüenciada com os iniciadores PLAMF e PLAMR. De acordo com a análise da seqüência obtida verificamos que o clone A1 apresenta de fato, o gene da PLA<sub>2</sub> com a mutação (Fig. 27). A construção final no elemento de transposição pode ser visualizada na representação esquemática (Fig. 28). Utilizamos a região 5'-UTR contendo o promotor da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae* (AgPer1 - 2,5kb) para secretar imediatamente após a alimentação sanguínea a PLA<sub>2</sub>m (0,5kb) no lúmen do intestino de mosquitos *Ae. fluviatilis* transgênicos. Além disso, também foi incluído na construção uma seqüência de 900pb da região 3'-UTR do próprio AgPer1, com intuito de estabilizar a produção do RNAm da PLA<sub>2</sub>m. Para a detecção da (s) linhagem(ns) transgênica(s) é necessário o uso de marcadores específicos. Neste estudo, utilizamos o gene que codifica a proteína verde fluorescente (com fluorescência melhorada), o EGFP, e para dirigir a expressão do gene marcador utilizamos o promotor 3xP3, específico de tecidos neurais, olho e papilas anais do inseto. Neste estudo utilizamos o elemento de transposição *piggyBac* que continha o gene marcador EGFP sendo dirigido pelo promotor específico de tecidos neurais, olho e papilas anais do mosquito. O gene híbrido (contendo as seqüências 5'-UTR e 3'-UTR do promotor AgPer1 e o gene de bloqueio PLA<sub>2</sub>m) foi inserido neste vetor para posterior uso na microinjeção de embriões de mosquitos *Ae. fluviatilis*.





**Figura 28: Diagrama esquemático da construção pBac[3xP3-EGFPam]-AgPer1-PLA<sub>2</sub>m utilizada para transformação de *Ae. fluviatilis*:** A construção consiste na seqüência 5'-UTR/promotor da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae* (AgPer1) ligada à seqüência da fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de abelha mutada (PLA<sub>2</sub>m) seguida pela seqüência flanqueadora 3'-UTR do AgPer1. Os braços direito e esquerdo do elemento de transposição (*piggyBacD* e *piggyBacE*) estão representados pelas setas grandes invertidas. As setas pequenas indicam o início da transcrição. Os sítios de enzimas de restrição são: *B*, *Bam*H I; *Bg*, *Bgl* II; *Fs*, *Fse* I; *K*, *Kpn* I; *P*, *Pst* I; *N*, *Not* I; *S*, *Sac* II. A figura não se encontra em escala de tamanho dos fragmentos.

### 5.3.10. Transformação de mosquitos *Aedes fluviatilis* com o transposon *piggyBac*

Setecentos e setenta embriões de mosquitos *Ae. fluviatilis* foram injetados com uma mistura de DNA, contendo o elemento de transposição *piggyBac* e o plasmídeo auxiliar (*Helper*) phsp-pBac. Deste total, 108 atingiram a fase larval apresentando uma taxa de sobrevivência de 25% em relação ao experimento controle (Controle 1) no qual não houve manipulação nenhuma dos ovos. Oitenta e quatro larvas injetadas chegaram à fase adulta formando 16 famílias, porém a família 16 não apresentou descendentes férteis. Das 15 famílias férteis, quatro delas (4T, 8T, 9T e 10T) produziram descendentes expressando o gene marcador EGFP apresentando, assim, uma freqüência de transformação de 27% (Tabela 5).

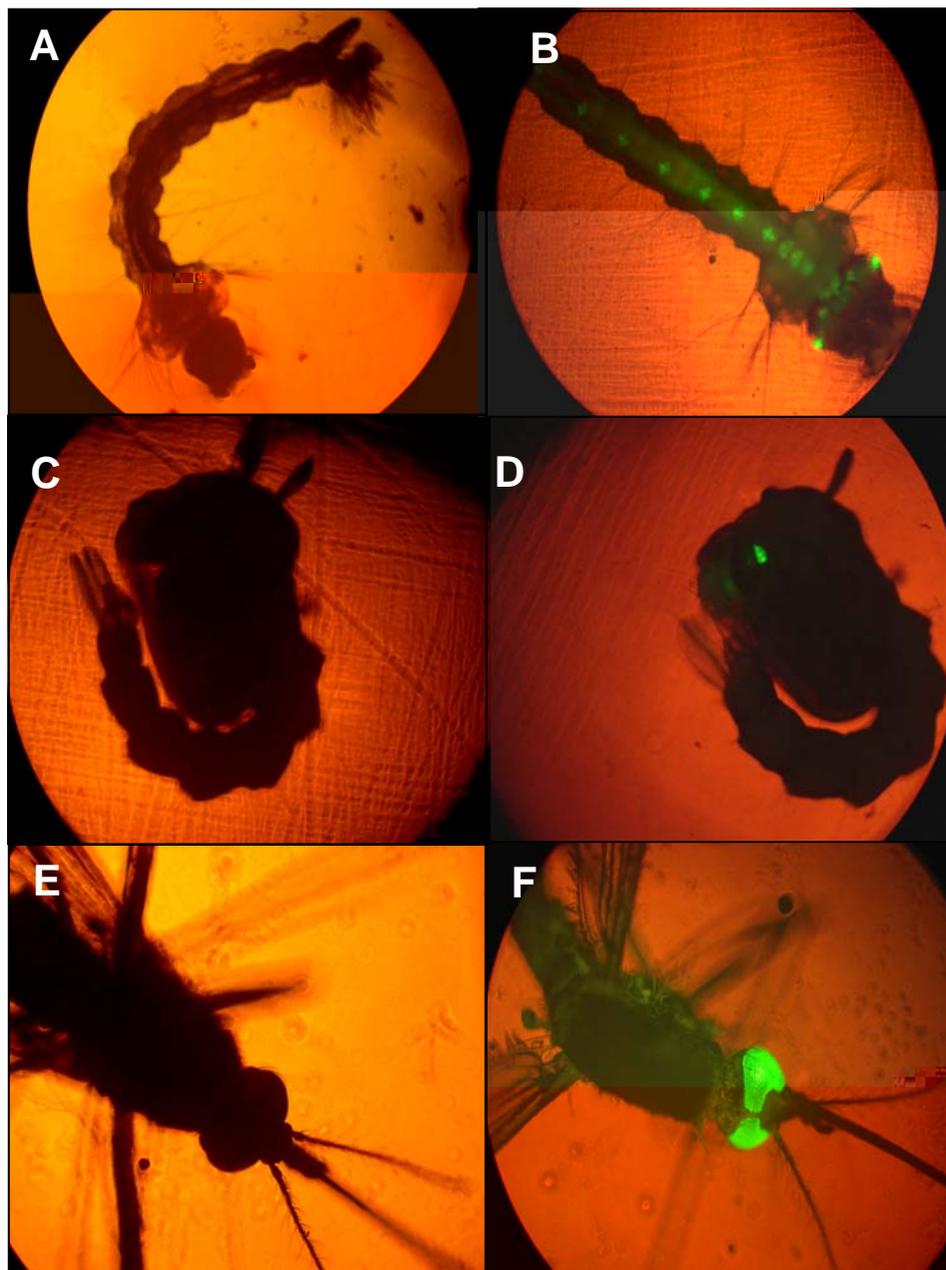
Tabela 5. Número de embriões injetados, sobrevivência dos adultos, número de famílias transgênicas e a frequência de transformação em mosquitos *Aedes fluviatilis*.

Experimento <sup>a</sup>	Número de embriões	Larvas (%eclosão)	Sobrevivência adultos	Famílias férteis	Famílias transgênicas	Frequência de transformação <sup>c</sup>
Controle 1	254	140	-	-	-	-
Controle 2	236	83 (64%)	-	-	-	-
Injetados	770	108 (25%)	84	15	4	27%

<sup>a</sup> Controle 1 são embriões não manipulados. Controle 2 são embriões manipulados porém não injetados.

<sup>b</sup> Para o cálculo da porcentagem de larvas, o controle 1 foi considerado como 100%.

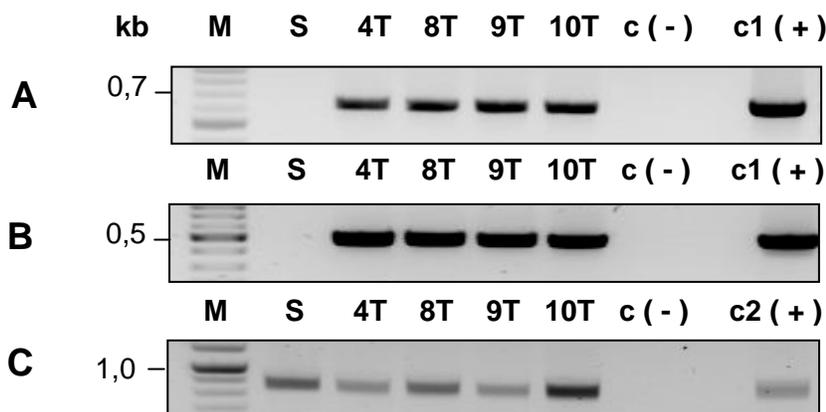
<sup>c</sup> A frequência de transformação em mosquitos transgênicos foi de 27% (15 famílias férteis / 55 famílias com larvas).



**Figura 29: Fotomicrografia de fluorescência mostrando a presença da expressão do gene marcador (EGFP):** Larva, pupa e mosquitos adultos selvagens e transgênicos de *Ae. fluviatilis* foram analisadas em microscópio invertido de epifluorescência no aumento de 40x. **A, C, E:** Larva, pupa e adulto selvagens, respectivamente. **B, D, F:** larva, pupa e adulto transgênicos respectivamente.

### 5.3.12. Amplificação do gene marcador e do gene de bloqueio

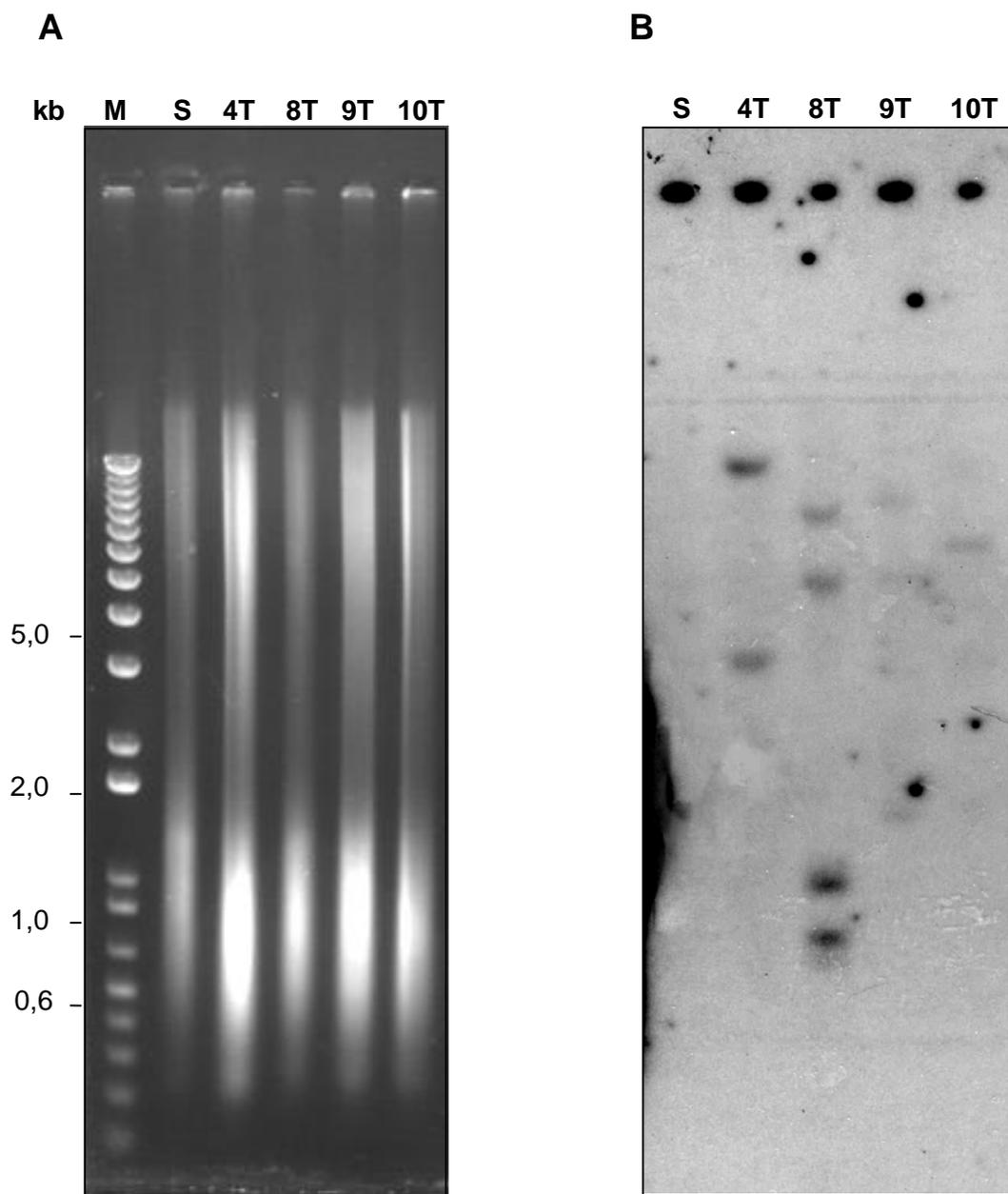
Pela técnica de PCR, observou-se a presença do gene marcador, EGFP, e do gene de bloqueio, PLA<sub>2</sub>m, em todas as linhagens transgênicas, confirmando a integração dos mesmos no genoma do mosquito (Fig. 30). Na linhagem selvagem não foi encontrado nenhum produto de amplificação, como esperado. Os tamanhos dos produtos obtidos foram de aproximadamente 650pb, para o marcador EGFP (Fig. 30, A) e 500pb, para o gene de bloqueio PLA<sub>2</sub>m (Fig. 30, B), de acordo com a seqüência do EGFP e da PLA<sub>2</sub>m inseridas no elemento de transposição *piggyBac*, que foi utilizado como controle positivo na reação. Oligonucleotídeos específicos para o gene da actina de *Ae. aegypti* (Krebs *et al.*, 2002), foram usados como um controle da extração do DNA genômico, tendo a amplificação de um fragmento de 850pb, como esperado em todas as amostras testadas (Fig. 30, C).



**Figura 30: Amplificação através da PCR do gene marcador (EGFP) e do gene da PLA<sub>2</sub>m em amostras de DNA genômico extraídas de larvas selvagens e transgênicas de *Ae. fluviatilis*:** Uma alíquota de 1µl de DNA genômico de larvas selvagens (S) e transgênicas das linhagens 4T, 8T, 9T, 10T foram submetidas à PCR utilizando iniciadores específicos para amplificação dos três genes (**A**: EGFP, **B**: PLA<sub>2</sub> e **C**: Actina). Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio. **M**: marcador de DNA 100 pb; **c(-)**: ausência de DNA; **4T, 8T, 9T, 10T**: linhagens transgênicas; **S**: linhagem selvagem; **c1(+)**: *pBacEGFP*AgPer1PLA<sub>2</sub>m; **c2(+)**: DNA genômico de *Ae. aegypti*.

### 5.3.13. Integração do gene da PLA<sub>2</sub>m no genoma de mosquitos *Aedes fluviatilis* transgênicos

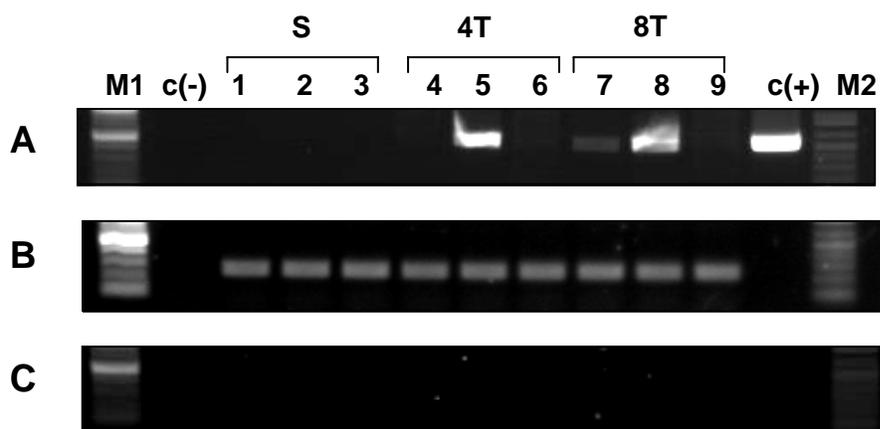
Para verificar a presença do gene da PLA<sub>2</sub>m, amostras de DNA genômico de mosquitos selvagens e transgênicos (4T, 8T, 9T e 10T) foram digeridas com a enzima *Bgl* II. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose a 0,7% corado com brometo de etídio (Fig. 31 - A). Os fragmentos de DNA foram transferidos para uma membrana de náilon e hibridizados com uma sonda contendo a seqüência do braço esquerdo do elemento *piggyBac*, marcada com <sup>32</sup>P através da técnica de *Southern Blot*. Podemos observar a hibridização dos fragmentos de 12 e 3kb na linhagem 4T, de ~10, 3, 1 e 0,6kb na linhagem 8T, de ~11, 5 e 1,4kb na linhagem 9T e de ~7 e 1,5kb na linhagem 10T que confirmam a integração do gene híbrido no genoma dos mosquitos *Ae. fluviatilis* transgênicos (Fig. 31 - B). Como esperado não houve hibridização de fragmentos no genoma dos mosquitos selvagens.



**Figura 31: Integração do gene híbrido no genoma de mosquitos *Ae. fluviatilis* transgênicos:** (A) Cerca de 10 $\mu$ g do DNA genômico de mosquitos selvagens e transgênicos foram digeridos com a enzima *Bgl* II a 37°C por 12h. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose a 0,7%, corado com brometo de etídio (B) Membrana de náilon hibridizada, através da técnica de *Southern Blot*, com uma sonda de 0,8kb marcada com  $^{32}$ P, correspondente ao braço esquerdo do *piggyBac*.

### 5.3.14. Expressão do RNA mensageiro da PLA<sub>2m</sub>

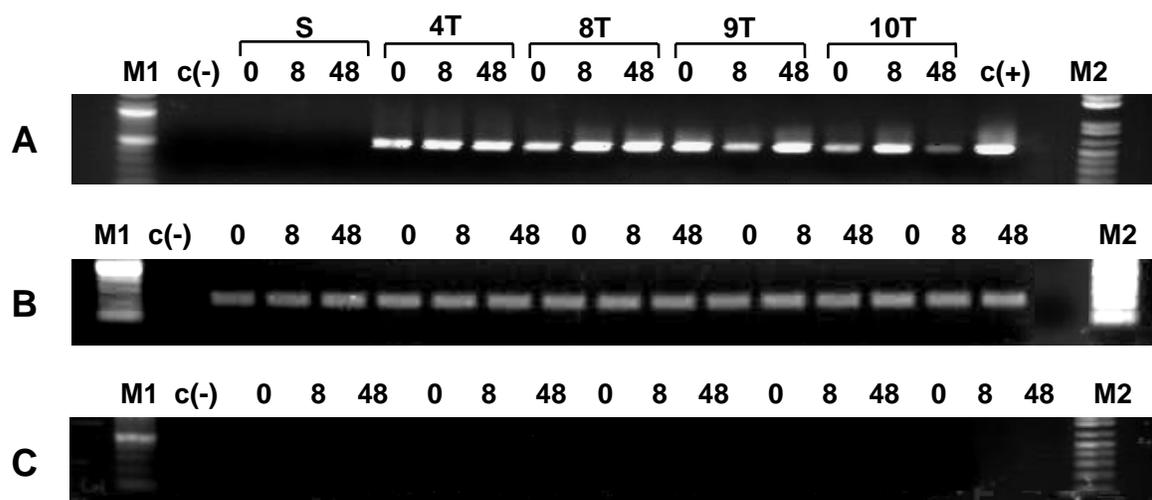
Amostras de RNA total de carcaças (de fêmeas) e intestinos (de machos e fêmeas) de mosquitos transgênicos (4T, 8T) e selvagens, antes (somente machos) e após alimentação sanguínea (24h), foram submetidas à RT-PCR. Observamos a presença de um fragmento majoritário de 0,5kb, correspondente ao gene de bloqueio, a PLA<sub>2m</sub>, nas amostras de cDNA de intestino de fêmeas de ambas as famílias transgênicas, e a presença minoritária do mesmo fragmento em amostras de cDNA da carcaça de fêmeas da família 8T, possivelmente, devido a uma contaminação da carcaça com o intestino no momento da dissecação (Fig. 32, A). Como esperado não houve amplificação do gene de bloqueio em intestinos e carcaças de mosquitos selvagens. Para nos certificarmos de que todas as amostras continham RNA (cDNA), utilizou-se como controle iniciadores para amplificação do gene constitutivo, que codifica a proteína ribossomal, RP49 do mosquito *Ae. aegypti* (Gentile *et al.*, 2005) (Fig. 32, B). Para este gene observou-se a presença de RNAm em todas as amostras de cDNA de intestinos e carcaças das linhagens selvagem e transgênicas, pela amplificação de um fragmento de ~220pb. Como controle negativo foram utilizados amostras de cDNA de intestinos e carcaças de mosquitos selvagens e transgênicos, onde a enzima transcriptase reversa (RT) não foi adicionada, para descartarmos a possibilidade de contaminação com DNA genômico (Fig. 32, C).



**Figura 32: Expressão do RNA mensageiro da PLA<sub>2</sub>m em mosquitos *Ae. fluviatilis* transgênicos:** Amostras de RNA total de carcaça e intestino de mosquitos selvagens e transgênicos (4T, 8T) foram submetidas à RT-PCR utilizando iniciadores específicos para amplificação do gene da PLA<sub>2</sub>m (**A**) e do gene constitutivo RP49 (ribossomal) (**B**) e do gene da PLA<sub>2</sub>m em amostras sem a adição da transcriptase reversa (**C**). Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio. **M1**: marcador de DNA 100pb; **M2**: marcador de DNA 1kb plus; **c(-)**: ausência de DNA; **4T, 8T**: linhagens transgênicas; **S**: linhagem selvagem; **c(+)**: pBacEGFP<sub>AgPer1</sub>PLA<sub>2</sub>m; (**1, 4, 7**): carcaça; (**2, 5, 8**): intestino de fêmeas 24h após a alimentação sanguínea; (**3, 6, 9**): intestinos de machos.

### 5.3.15. Cinética da expressão do RNA mensageiro do gene da PLA<sub>2m</sub> em intestinos de fêmeas de mosquitos transgênicos

Após a extração do RNA total de amostras de intestino de mosquitos transgênicos (4T, 8T, 9T, 10T) e selvagens antes (0h) e após alimentação sanguínea (8, 48h), as amostras foram submetidas a RT-PCR, utilizando iniciadores específicos. Na figura 33. A, observamos que não houve diferença na expressão do RNA mensageiro (RNAm) da PLA<sub>2m</sub> após a alimentação sanguínea no intervalo de tempo analisado, exceto na linhagem selvagem, como esperado. Como controle utilizou-se iniciadores para a amplificação do gene constitutivo RP49 (Gentile *et al.*, 2005). Para este gene observou-se a presença de RNAm em todas as amostras das linhagens selvagem e transgênicas (4T e 8T, 9T e 10T) (Fig. 33, B). Quando realizamos a reação de produção de cDNA sem a enzima transcriptase reversa nos certificamos de que não houve contaminação de DNA genômico nas amostras (Fig. 33, C).



**Figura 33: Cinética da expressão do RNA mensageiro da PLA<sub>2m</sub> nas linhagens transgênicas de *Ae. fluviatilis*:** Amostras de RNA total do intestino de mosquitos selvagens e transgênicos (4T, 8T, 9T, 10T) antes (0h) e após a alimentação sanguínea (8 e 48h) foram submetidas à RT-PCR. Nas reações foram utilizados iniciadores específicos para amplificação do gene da PLA<sub>2m</sub> (A) e do gene constitutivo RP49 (ribossomal) (B) e do gene da PLA<sub>2m</sub> em amostras sem a adição da transcriptase reversa (C). Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio. **M1**: marcador de DNA 100pb; **M2**: marcador de DNA 1kb plus; **c(-)**: ausência de DNA; **S**: linhagem selvagem; **4T, 8T, 9T, 10T**: linhagens transgênicas; **c(+)**: pBacEGFPAgPer1PLA<sub>2m</sub>

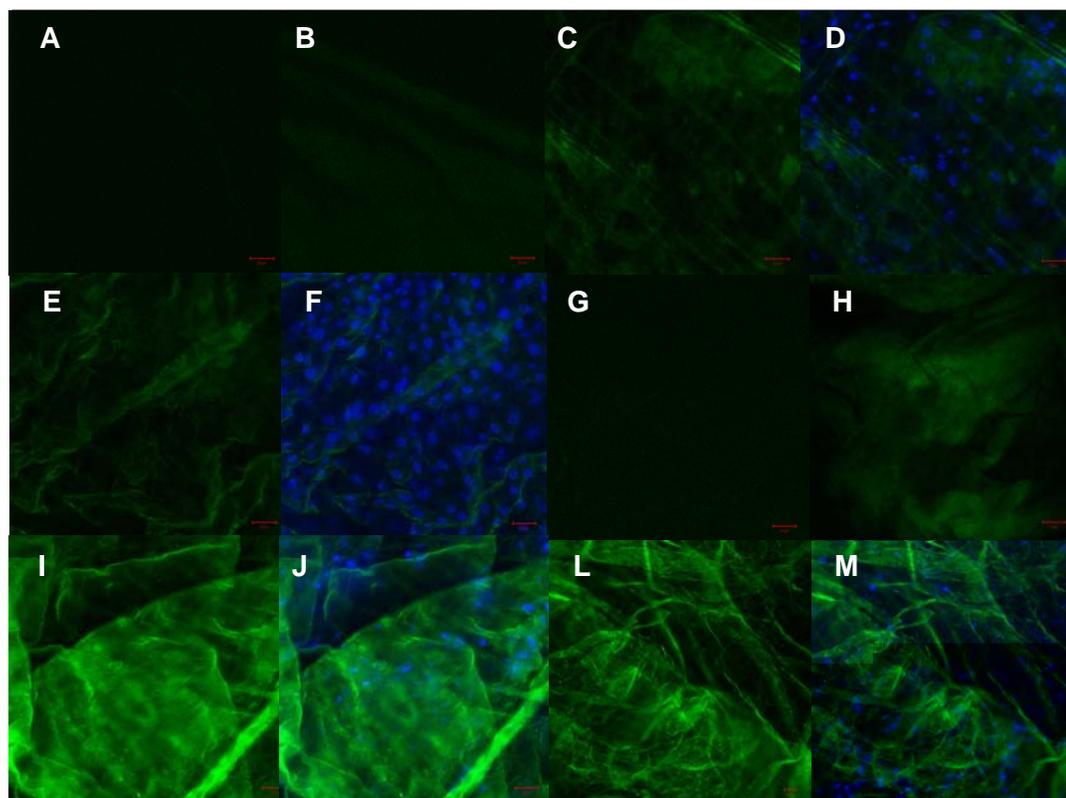
### 5.3.16. Cinética da expressão do RNAm da PLA<sub>2m</sub> da família 4T

Para verificar se a expressão do RNAm variou após a alimentação sanguínea, em menores intervalos de tempo, amostras de RNA total de intestino de mosquitos selvagens e transgênicos da família 4T, alimentados em diferentes intervalos de tempo (1, 4, 8, 16, 24, 48, 60h), foram submetidas à RT-PCR. Observamos que a cinética da expressão do RNA mensageiro (RNAm) da PLA<sub>2m</sub> não variou nas amostras de RNA total dos intestinos dos mosquitos transgênicos nos intervalos de tempo analisados após a alimentação sanguínea. Não houve o aparecimento do fragmento correspondente à PLA<sub>2m</sub>, nos mosquitos selvagens, como esperado (Fig. 34, A) Amostras de RNA total foram amplificadas com iniciadores específicos para o gene constitutivo RP49 (Gentile *et al.*, 2005), utilizado como um controle da reação de RT-PCR (Fig. 34, B). Para este gene observou-se a presença de RNAm em todas as amostras das linhagens selvagem e transgênica (4T). Novamente, como esperado, não obtivemos amplificação quando omitimos a transcriptase reversa na produção de cDNA (Fig. 34, C).

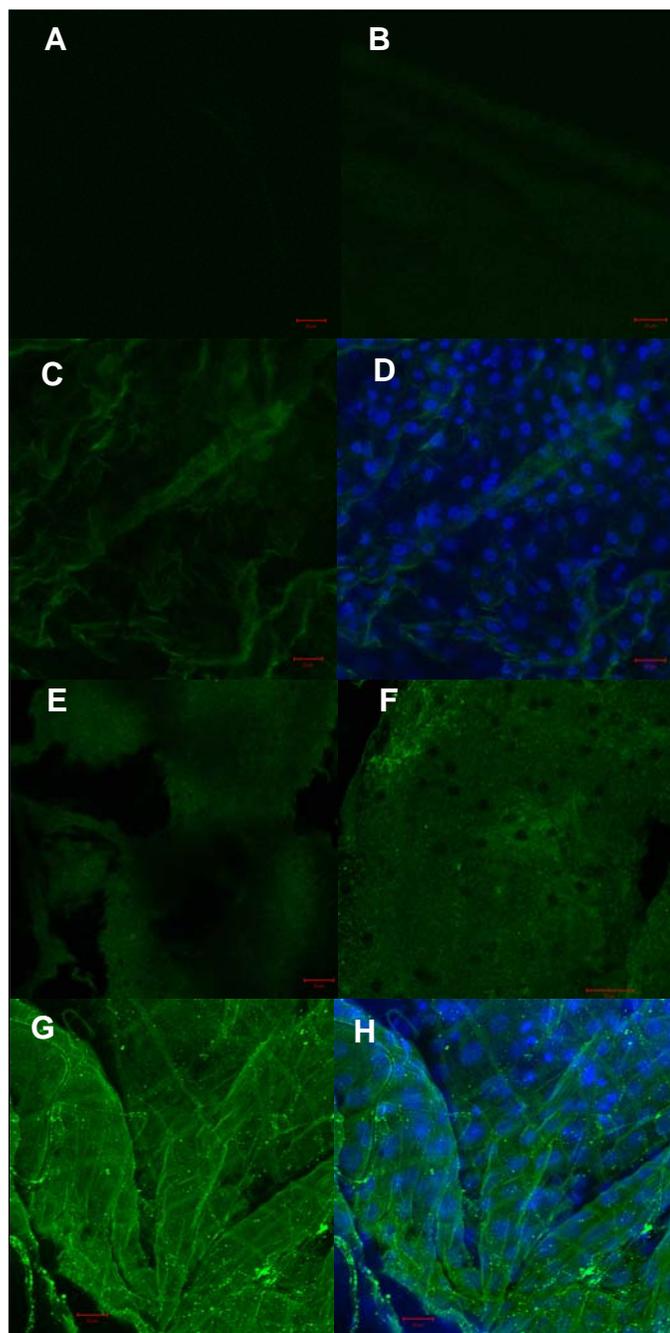
**Figura 34: Cinética da expressão do RNA mensageiro da PLA<sub>2</sub>m na família 4T:** Amostras de RNA total do intestino de mosquitos selvagens e transgênicos (4T) antes (0h) e após a alimentação sanguínea (1, 4, 8, 16, 24, 48 e 60h) foram submetidas à RT-PCR. Nas reações foram utilizados iniciadores específicos para amplificação do gene da PLA<sub>2</sub>m (**A**) e do gene constitutivo RP49 (ribossomal) (**B**) e do gene da PLA<sub>2</sub>m em amostras sem a adição da transcriptase reversa (**C**). Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio. **M1:** marcador de DNA de 100pb;045 Tm(or de DNA )Tj10.98 0 0 10.98

### 5.3.17. Localização da proteína PLA<sub>2m</sub> por microscopia confocal

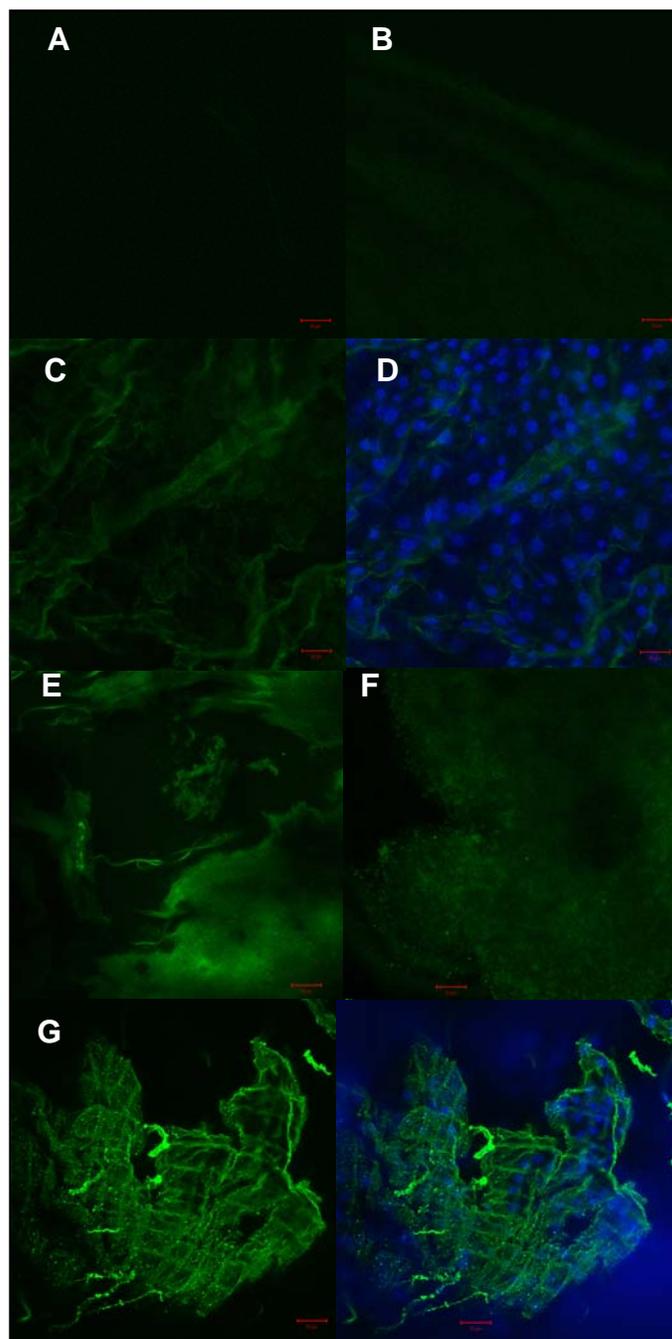
Para localização da proteína PLA<sub>2m</sub> nos mosquitos transgênicos, os intestinos foram dissecados 4h após a alimentação sangüínea, tratados com anticorpos específicos e analisados ao microscópio confocal. Observamos uma marcação homogênea ao longo do intestino na linhagem 4T tratada com anticorpo policlonal contra PLA<sub>2</sub> comercial (Fig. 35, I e J) e nas linhagens 8T e 10T quando tratadas com anticorpo contra PLA<sub>2m</sub> (Fig. 35, L e M; Fig. 36, G e H). No entanto, a marcação da proteína na linhagem 10T tratada com anticorpo policlonal contra PLA<sub>2m</sub> (Fig. 37, G e H) parece ser mais específica em algumas regiões do intestino, já na linhagem 8T, além da marcação homogênea existem marcações pontuais ao longo do intestino (Fig. 36, G e H). Amostras de intestinos de mosquitos selvagens e transgênicos (4T, 8T e 10T) tratados com anticorpos secundários anti-IgG de coelho marcado com o composto fluorescente Alexa fluor 488 e amostras somente fixadas, foram utilizadas como controle da marcação. Como esperado não houve marcação inespecífica nos controles negativos (Fig. 35, A – H, Figs. 36 e 37, A – F). A coloração dos núcleos celulares foi obtida pela marcação com DAPI (Fig. 35: D e F; J e M; Figs. 36 e 37: D e H), evidenciando a preservação das características morfológicas do material biológico. Todas as amostras foram visualizadas ao microscópio confocal no aumento de 400x com exceção das amostras L e M (Fig. 35) visualizadas no aumento de 200x, utilizando o filtro 505-550nm.



**Figura 35. Marcação por imunofluorescência do intestino de mosquitos selvagens e transgênicos (4T) com anticorpos contra PLA<sub>2</sub> e PLA<sub>2</sub>m:** Controles: Intestino de mosquito selvagem fixado (A), tratado apenas com anticorpo secundário (B), com anticorpo policlonal contra PLA<sub>2</sub>m e anticorpo secundário anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 (C) e marcado com DAPI (D), com anticorpo policlonal contra PLA<sub>2</sub> (comercial) e anticorpo secundário anti-IgG de coelho (E) e marcado com DAPI (F), Intestino de mosquito da família 4T fixado (G), tratado com anticorpo secundário (H), com anticorpo policlonal contra PLA<sub>2</sub> comercial e anticorpo secundário anti IgG de coelho Alexa 488 (I) e marcado com DAPI (J), anticorpo policlonal contra PLA<sub>2</sub>m e anticorpo secundário anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 (L) e marcado com DAPI (M). Aumentos 200x (somente L e M) e 400x (os demais), laser 488, filtro 505 – 550nm.



**Figura 36. Marcação por imunofluorescência do intestino de mosquitos selvagens e transgênicos (8T) com anticorpos contra PLA<sub>2</sub>m:** Controles: Intestino de mosquito selvagem fixado (A), tratado com anticorpo secundário (B), com anticorpo policlonal contra PLA<sub>2</sub>m e anticorpo secundário anti IgG de coelho Alexa Fluor 488 (C) e marcado com DAPI (D). Intestino de mosquito da família 8T fixado (E), tratado com anticorpo secundário (F), com anticorpo policlonal contra PLA<sub>2</sub>m e anticorpo secundário anti IgG de coelho Alexa Fluor 488 (G) e marcado com DAPI (H). Aumento 400x, laser 488, filtro 505 – 550nm.



**Figura 37. Marcação por imunofluorescência do intestinos de mosquitos selvagens e transgênicos (10T) com anticorpos contra PLA<sub>2</sub>m:** Controles: Intestino de mosquito selvagem fixado (A), tratado com anticorpo secundário (B), com anticorpo policlonal contra PLA<sub>2</sub>m e anticorpo secundário anti IgG de coelho Alexa Fluor 488 (C) e marcado com DAPI (D). Intestino de mosquito da família 8T fixado (E), tratado com anticorpo secundário (F), com anticorpo policlonal contra PLA<sub>2</sub>m e anticorpo secundário anti IgG de coelho Alexa Fluor 488 (G) e marcado com DAPI (H). Aumento 400x, laser 488, filtro 505 – 550nm.

---

### 5.3.18. Inibição do desenvolvimento de *P. gallinaceum* em mosquitos transgênicos

Para investigar o efeito da expressão da PLA<sub>2</sub>m sobre o desenvolvimento do parasita, mosquitos selvagens e transgênicos foram alimentados na mesma ave infectada com *P. gallinaceum*, sendo o número de oocistos determinado sete dias após a infecção. Em 13 experimentos independentes, utilizando as quatro linhagens transgênicas, a formação de oocistos foi inibida de 17,5 a 68,5%, quando comparado com os mosquitos selvagens. Houve diferença significativa entre as médias de oocistos dos mosquitos transgênicos quando comparado com os mosquitos selvagens (Tabela 6).

Tabela 6: Efeito da expressão da PLA<sub>2</sub>m sobre a formação de oocistos de *P. gallinaceum*.

Experimento	Mosquitos	Prevalência <sup>a</sup>	Oocisto <sup>b</sup>	Inibição <sup>c</sup>
1	Controle	96% (43/45)	51,9 (0-170)	-
	4T	86,2% (25/29)	26 (0-63)	<b>49,9%**</b>
2	Controle	96,4% (27/28)	41,9 (0-148)	-
	4T	75% (21/28)	13,4 (0-136)	<b>68%**</b>
3	Controle	90% (29/32)	83,6 (0-287)	-
	4T	86% (19/22)	40,1 (0-168)	<b>52%**</b>
4	Controle	87,5% (35/40)	104,75 (0-240)	-
	4T	71% (16/21)	65,6 (0-259)	<b>37,3%**</b>
5	Controle	80,6% (25/31)	26,4 (0-136)	-
	8T	75,6% (31/41)	19,4 (0-120)	<b>26,5%*</b>
6	Controle	74% (20/27)	12,7 (0-50)	-
	8T	59% (13/22)	4 (0-44)	<b>68,5%*</b>
7	Controle	85,2% (41/49)	48 (0-213)	-
	8T	75% (23/30)	34 (0-200)	<b>21,9%*</b>
8	Controle	83,3% (30/36)	34,8 (0-160)	-
	9T	71,4% (15/21)	20,5 (0-64)	<b>41,2%*</b>
9	Controle	100% (39/39)	49,8 (1-172)	-
	9T	80,9% (17/21)	41,2 (0-184)	<b>17,5%*</b>
10	Controle	78,3% (18/23)	11,9 (0-71)	-
	9T	65% (13/20)	8,6 (0-40)	<b>27,7%*</b>
11	Controle	87,5% (21/24)	7,5 (0-56)	-
	10T	81,8% (9/11)	3,8 (0-9)	<b>49,3%**</b>
12	Controle	93% (38/40)	63,8 (0-212)	-
	10T	50% (10/20)	27,1 (0-124)	<b>57,5%**</b>
13	Controle	100% (32/32)	120,4 (12-291)	-
	10T	85,7% (19/21)	84,4 (0-198)	<b>30%**</b>

<sup>a</sup> Porcentagem de mosquitos infectados (número de mosquitos infectados/número total de mosquitos)

<sup>b</sup> Média do número de oocistos por intestino. Os valores observados estão indicados entre parêntese.

<sup>c</sup>  $100 - [(média\ do\ número\ de\ oocistos\ por\ intestino\ em\ mosquitos\ transgênicos / média\ do\ número\ de\ oocistos\ por\ intestino\ nos\ mosquitos\ controles) \times 100]$ . As médias de oocistos dos mosquitos transgênicos e não-transgênicos foram comparadas pelo teste Mann Whitney.

\*\*  $p < 0,001$ , para as famílias 4T e 10T e \*  $p < 0,05$ , para as demais famílias.

## DISCUSSÃO

---

---

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Atividade antiparasítica da gomesina

Estudos prévios mostraram que o peptídeo gomesina é um potente antimicrobiano, inibindo o desenvolvimento de bactérias, fungos, levedura e do protozoário *Leshmania amazonensis* (Silva *et al.*, 2001). Neste estudo, analisamos o efeito do peptídeo antimicrobiano gomesina, no desenvolvimento de parasitas da malária, para verificar sua possível utilidade como um agente terapêutico para indivíduos infectados e/ou como uma molécula efetora para expressão em mosquitos transgênicos. A gomesina foi capaz de inibir o desenvolvimento das formas intra-eritrocíticas de duas cepas de *P. falciparum*, com IC<sub>50</sub> de 76 - 87 $\mu$ M (Fig. 7), embora a lise das hemácias fosse observada quando a gomesina foi adicionada à cultura. Um estudo recente mostrou que na concentração de 1 $\mu$ M a gomesina induz uma hemólise de 16%, embora não sendo linearmente dependente da dose, e atinge aproximadamente 40% quando a concentração é aumentada para 100 $\mu$ M (Fazio *et al.*, 2006). Não é conhecido se a gomesina mata os parasitas da malária pela interação direta com a membrana, ou indiretamente pela lise das hemácias. O peptídeo antimicrobiano, dermaseptina S4, lisa os eritrócitos infectados a uma concentração 30 vezes menor do que lisa células não infectadas (Dagan *et al.*, 2002). No sangue, os parasitas da malária modificam a superfície e o citoplasma dos eritrócitos, exibindo receptores codificados pelo parasita e canais de sódio sobre a superfície do eritrócito (Templeton e Deitsch, 2005) e isto, poderia explicar a diferente susceptibilidade das células infectadas e não infectadas a dermaseptina S4. É possível que a mesma observação seja válida para a atividade da gomesina, entretanto, esta hipótese ainda precisa ser investigada.

O grupo da Dr. Sirlei Daffre, da Universidade de São Paulo (USP), vem trabalhando para gerar análogos de gomesina com efeito hemolítico reduzido, que mantenham atividade antimicrobiana. Recentemente, foi selecionado um análogo linear que é estável no soro humano e potente contra a levedura *Candida albicans*, este é quatro vezes menos hemolítico (Fazio *et al.*, 2006) e sua atividade anti-*Plasmodium* ainda necessita ser avaliada. Nossos experimentos demonstram a atividade da gomesina sobre duas cepas do estágio sanguíneo de *P. falciparum*. Entretanto, devido a sua atividade hemolítica, ensaios in vivo precisam ser

realizados para avaliar o potencial deste peptídeo como uma droga antimalárica.

A gomesina também inibiu o desenvolvimento de espécies de *Plasmodium* no estágio esporogônico. In vitro nós observamos seu efeito antiparasítico com a inibição da formação de oocinetos e gametas de *P. berghei*. Entretanto, fomos incapazes de comparar a eficiência do bloqueio nestes dois diferentes estágios, pois pode haver um efeito cumulativo de gametas a oocinetos (Moreira *et al.*, 2007 – ver anexo 2). Estudos similares com outros peptídeos antimicrobianos mostram diferentes efeitos inibitórios sobre diferentes formas sexuais de *Plasmodium* para uma concentração fixa de peptídeos (Conde *et al.*, 2000; Arrighi *et al.*, 2002), principalmente devido a mudanças no repertório de proteínas da superfície (Carter e Kaushal, 1984; Kaushal e Carter, 1984), e possíveis mudanças na composição lipídica durante o desenvolvimento do parasita, como descrito para outros protozoários (Buscaglia *et al.*, 2004). A troca de proteínas e lipídeos da superfície pode alterar a carga da superfície e a hidrofobicidade das células, afetando assim a atividade antimicrobiana do peptídeo (Powers e Hancock, 2003). Acreditamos que o mecanismo de ação da gomesina seja através da permeabilização da membrana do plasmódio, como previamente determinado para os parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. (S. Daffre, dados não publicados). Experimentos *in vivo* mostram que mosquitos alimentados com sangue infectado na presença da gomesina desenvolvem menos oocistos. A redução do número de oocistos pode provavelmente ser atribuído ao menor número de oocinetos formados, embora um efeito direto sobre oocistos não deva ser descartado. Por exemplo, a injeção de 50µM dos peptídeos sintéticos ILF e Vida 3 (obtidos a partir de peptídeos anfipáticos com ação contra fungos e protozoários) na hemolinfa de mosquitos *Anopheles* infectados, conduzem a uma redução superior a 90% do número de oocistos (Arrighi *et al.*, 2002).

O amplo efeito da gomesina nos estágios de espécies de *Plasmodium* no mosquito, sua baixa toxicidade aos mosquitos quando administrado por via endovenosa em camundongos (Moreira *et al.*, 2007), fazem deste peptídeo um candidato promissor para ser expresso em mosquitos geneticamente modificados, dirigido por promotores tais como carboxipeptidase (AgCP) ou peritrofinas (AgPer). Baseando-se no ciclo de vida do parasita no intestino do mosquito, há um tempo relativamente amplo (de minutos até 24h após alimentação sanguínea) que a gomesina pode atuar como uma molécula antiparasítica, quando apresentada no lúmen intestinal do inseto. A eficácia da gomesina em bloquear os estágios sexuais

e esporogônicos indica que esta molécula pode ser expressa como um agente bloqueador em mosquitos geneticamente modificados.

Como a gomesina mostrou-se efetiva em inibir o desenvolvimento de espécies de *Plasmodium* no mosquito, iniciamos a construção do gene híbrido utilizando esta molécula para uso na geração de mosquitos *An. aquasalis* transgênicos. No entanto, a etapa de construção com este peptídeo, ainda não obteve sucesso, mesmo com diversas alterações no processo de clonagem, não foi possível sua inserção no vetor contendo o elemento de transposição *piggyBac*. No entanto, esforços estão sendo realizados para utilizar a gomesina na construção gênica para produção de mosquitos transgênicos. Assim, como alternativa iniciamos nosso estudo com um outro gene de bloqueio, a forma variante da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) do veneno de abelha, cedido por nossos colaboradores.

## 6.2. Desenvolvimento de mosquitos transgênicos para o gene da PLA<sub>2m</sub>

A manipulação genética de vetores transmissores de doenças é uma técnica que vem sendo utilizada por vários grupos de pesquisa. Com esta metodologia é possível inserir no genoma do mosquito genes que podem bloquear o desenvolvimento do microrganismo alvo. Seu uso começou a ser divulgado a partir de 1991 despertando grande interesse da comunidade científica e trazendo novas perspectivas no controle de mosquitos vetores de doenças, como por exemplo, da malária (Annon, 1991). Com os avanços da biotecnologia, hoje dispomos de informações com relação ao genoma do parasita, o *P. falciparum* (que causa a forma mais grave de malária) (Gardner *et al.*, 2002), do mosquito *Anopheles gambiae* (vetor mais importante da África) (Holt *et al.*, 2002), e do genoma humano, *Homo sapiens* (Mural *et al.*, 2002), trazendo perspectivas mais encorajadoras para o combate à doença. No presente trabalho, produzimos e caracterizamos linhagens de mosquitos *Aedes fluviatilis*, expressando o gene da PLA<sub>2m</sub>, como gene de bloqueio ao parasita da malária, o *P. gallinaceum*. Este é o primeiro estudo mostrando, com sucesso, a transformação de um vetor experimental de malária aviária na América Latina (Rodrigues *et al.*, 2006a – ver anexo 2).

No presente trabalho, verificou-se o efeito de uma forma mutada da PLA<sub>2</sub> do veneno de abelha, para torná-la inativa sobre o desenvolvimento de *P. gallinaceum*. Já havia sido demonstrado que a atividade enzimática da PLA<sub>2</sub> parece ser independente da atividade de bloqueio ao *Plasmodium* e da interferência no

desempenho dos mosquitos transgênicos (Moreira *et al.*, 2002; 2004). Para a expressão da proteína recombinante foi utilizado o vetor de expressão que possui uma cauda de histidina, pET32a, o que facilita a sua purificação. Quando sequenciamos o plasmídeo final, antes da expressão pudemos confirmar as mutações direcionadas para a inativação da enzima, uma no resíduo de histidina na posição 48 e a outra na asparagina na posição 43. Estas modificações resultaram em mudanças de aminoácidos no sítio ativo da enzima (Fig. 9). Embora não tenhamos testado sua atividade em ensaios enzimáticos evidências indiretas apontam em se tratar da proteína inativa, uma vez que sua forma ativa é altamente tóxica para bactérias (Riehle *et al.*, 2007) o que impossibilitaria sua expressão neste sistema.

Para testar o efeito da proteína recombinante sobre o desenvolvimento do plasmódio, a proteína inativa foi produzida em bactérias BL21(DE3)pLysS induzida por IPTG. Observamos que esta proteína foi encontrada predominantemente na sua forma insolúvel em corpúsculos de inclusão (Fig. 12). O fato da PLA<sub>2</sub>m se encontrar insolúvel nos levou ao uso de um sistema de purificação em condições desnaturantes. Por meio de cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel em pHs ácidos, a proteína recombinante pôde ser purificada. O tamanho da proteína recombinante obtida foi de cerca de 38kDa, sendo 20kDa do vetor e 18kDa da PLA<sub>2</sub>m (Fig. 13). Este tamanho adicional se deve à fusão da proteína de interesse com as seguintes seqüências do vetor: tioredoxina, caudas de histidina e sítio de clivagem para trombina.

Com intuito de verificar a atividade antiparasítica foram realizados ensaios de inibição do desenvolvimento do *Plasmodium gallinaceum*. A proteína PLA<sub>2</sub>m recombinante na concentração de 0,1µmol/l quando adicionada ao sangue infectado reduziu de 70 a 78,6% o número de oocistos de *P. gallinaceum* em mosquitos *Ae. fluviatilis* quando comparado com o controle (Tabela 4). Nossos resultados corroboram os resultados obtidos por Zieler *et al.* (2001), que mostraram que a PLA<sub>2</sub>m enzimaticamente inativa, com o composto brometo de bromofenacil, é capaz de reduzir significativamente o número de oocistos de *P. gallinaceum*. Entretanto, Riehle *et al.* (2007), utilizando o método de paratransgênese, um outro método para bloqueio do parasita em mosquitos, demonstraram que bactérias expressando a mesma variante da PLA<sub>2</sub> (utilizada neste estudo) foram capazes de reduzir em 23% o número de oocistos de *P. berghei*, quando presentes no intestino de *Anopheles stephensi*. Ainda não se sabe exatamente o mecanismo de ação da PLA<sub>2</sub> sobre o

plasmódio. No ciclo esporogônico, acredita-se que a proteína não tenha um efeito direto sobre o parasita, age prevenindo a ligação do oocineto ao epitélio intestinal devido a sua capacidade de ligação interfacial a lipídeos expostos na membrana (Berg *et al.*, 2001). No estágio intraeritrocítico seu efeito sobre o plasmódio é mediado pela hidrólise de lipoproteínas do soro levando a produção de produtos lipídicos tóxicos para o parasita (Guillaume *et al.*, 2004).

Com o intuito de identificar a expressão da PLA<sub>2</sub>m no intestino de mosquitos *Ae. fluviatilis* transgênicos, a proteína recombinante foi utilizada para a imunização de coelhos. Altos níveis de anticorpos policlonais mono-específicos foram obtidos nos soros dos coelhos imunizados, sendo a especificidade dos anticorpos no reconhecimento da proteína recombinante, confirmada por meio de imunoblotting.

Nos últimos seis anos a manipulação genética de mosquitos teve um grande progresso, no que se refere à identificação de elementos de transposição, marcadores para a seleção, caracterização de promotores para dirigirem a expressão de genes exógenos bem como a identificação de moléculas efetoras que possam interferir no desenvolvimento do parasita no hospedeiro invertebrado (Marreli *et al.*, 2006). Na busca de promotores para a transformação de mosquitos, diversos já foram identificados.

Neste trabalho, foi utilizado o promotor da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae* (AgPer) para dirigir a expressão do gene de bloqueio, da PLA<sub>2</sub>m, no intestino de mosquitos *Ae. fluviatilis* após a alimentação sanguínea (Fig. 28). Em anofelinos, este promotor é expresso somente em fêmeas adultas e é capaz de direcionar a secreção e incorporação da proteína na matriz peritrófica que envolve o bolo sanguíneo no intestino (Shen e Jacobs-Lorena, 1998; Devenport *et al.*, 2004). Durante o ciclo no mosquito é importante considerar que o *Plasmodium* atravessa dois epitélios, o intestino médio e a glândula salivar (Ghosh *et al.*, 2000) após a alimentação sanguínea. Desta forma, é importante que o promotor possa dirigir a expressão do gene de bloqueio naqueles locais. Outro promotor, como a carboxipeptidase de *Ae. aegypti* (AeCP) induz a expressão no intestino 24h após a alimentação sanguínea (Edwards *et al.*, 1997), momento que coincide com a síntese de enzimas digestivas do mosquito. Desta forma, a proteína de bloqueio estaria mais vulnerável à ação das enzimas presentes no intestino do mosquito. O uso de promotores que induzem a secreção tardia, no intestino, pode ser desvantajoso em alguns casos, principalmente no que se refere à ação direta das enzimas digestivas do mosquito sobre a molécula de interesse. Essa possibilidade é menor quando

utilizamos o promotor da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae*, AgPer1, uma vez que induz a secreção da molécula precocemente após a alimentação sanguínea (Abraham *et al.*, 2005).

Para a transformação de mosquitos foi utilizado um sistema duplo de vetores, contendo um elemento de transposição e um vetor que irá expressar a enzima transposase para que o gene de interesse seja integrado ao genoma. Neste trabalho, foi utilizado para a transformação de mosquitos *Ae. fluviatilis* o elemento de transposição *piggyBac* e o plasmídeo auxiliador, *pHelper*. O transposon *piggyBac* inativo foi utilizado por já ter sido empregado anteriormente para a geração estável de várias espécies de insetos, inclusive mosquitos (Kim *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2002; Abraham *et al.*, 2005) e de ter a capacidade de inserir em sítios específicos (TTAA) e não conter a enzima transposase, impossibilitando sua movimentação no genoma. Este elemento também tem sido utilizado com grande êxito na transformação de células de mamíferos (Ding *et al.*, 2005) e de parasitas, como *P. falciparum* (Balu *et al.*, 2005). Já o plasmídeo *phsp-pBac (Helper)*, foi utilizado pois contém uma transposase que apresenta grande especificidade de ligação à seqüência de DNA alvo (Kaminski *et al.*, 2002; Maragathavally *et al.*, 2006), possibilitando que o gene seja integrado de forma estável no genoma do mosquito, uma vez que este vetor não contém os braços do elemento de transposição. Apesar da expressão da transposase do plasmídeo *helper* estar sendo dirigida pelo promotor da proteína HSP70 (*heat shock protein*) de *Drosophila* (Lis *et al.*, 1983), em alguns trabalhos utiliza-se o choque térmico para a sua ativação (Kokoza *et al.*, 2001; Lobo *et al.*, 2002), mas em outros foi observado que é desnecessário o uso do choque térmico para estimular a transformação dos embriões (Moreira *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004), pois este vetor tem uma atividade basal que possibilita a produção de transposase suficiente para a integração do *piggyBac* (Catteruccia *et al.*, 2000b).

Diversas espécies de insetos, de diferentes ordens já foram transformadas, incluindo dípteros, coleópteros, himenópteros. Na ordem dos dípteros várias espécies de mosquitos já foram transformadas entre elas, os mosquitos *Ae. aegypti* (Kokoza *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2000), *An. gambiae* (Kim *et al.*, 2004), *An. stephensi* (Ito *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2002; Abraham *et al.*, 2005), *An. albimanus* (Perera *et al.*, 2002). Em nosso trabalho mostramos a transformação da primeira espécie de mosquito transgênico produzido no Brasil.

A modificação genética de mosquitos envolve várias etapas sendo a microinjeção dos embriões a primeira e uma das mais importantes etapas. Para que

o processo tenha êxito, é necessário a padronização da técnica de acordo com as características da espécie a ser transformada. Ao adaptarmos a metodologia descrita por Ito *et al.* (2002), para transformar o mosquito *Ae. fluviatilis*, observamos vários detalhes do processo que comprometiam o resultado final do nosso estudo. Observamos alta mortalidade de larvas que na tentativa de buscarem a água morriam sobre o papel colocado na placa após a injeção, além da toxicidade da cola presente na fita dupla-face utilizada para fixar os embriões. Além disso, observamos que a taxa de sobrevivência dos embriões injetados era extremamente baixa, inferior a 5%, e poucas chegavam à fase adulta (mosquito). Desta forma, a metodologia de microinjeção de embriões de mosquitos *Ae. fluviatilis* foi exaustivamente padronizada e otimizada, para diminuir a mortalidades dos embriões e larvas.

As adaptações da técnica foram feitas em várias etapas. Antes da transferência dos ovos para uma placa contendo água, estes eram lavados três vezes em água tipo I. Esta água é purificada em filtro 0,22 $\mu$ m, o que a torna livre principalmente de contaminantes bacterianos. Isso porque a microinjeção pode ser “considerada como um processo cirúrgico” no embrião, no qual este se torna susceptível a infecções por microrganismos, em decorrência da lesão no ovo. Além disso, a lavagem possibilitava a remoção do excesso de cola da fita dupla-face, bem como do óleo. Considerando que a espécie em que Ito e colaboradores (2002), empregaram a técnica de microinjeção, se tratava de um anofelino, algumas modificações também foram feitas com relação à manipulação dos ovos após a microinjeção. Após a lavagem os ovos foram transferidos para placas contendo água, mas para diminuir a mortalidade das larvas foi colocado papel de filtro para evitar a dessecação do ovo na tampa ou na parede da placa. Desta forma aumentamos a sobrevivência dos embriões injetados para cerca de 25%, com a obtenção de 108 larvas que ao se tornarem mosquitos adultos, nos possibilitou a formação de 15 famílias férteis. Após a análise individual de 22.000 larvas para a detecção do gene marcador foram encontradas quatro famílias transgênicas (Tabela 4). Semelhante a este estudo Abraham *et al.* (2005), obtiveram 16 famílias de mosquitos *An. stephensi* contendo indivíduos selvagens e microinjetados, sendo quatro destas transgênicas.

Alguns trabalhos anteriores mostravam que a eficiência na transformação de mosquitos é baixa, sendo em torno de 1% para *An. gambiae* (Grossman *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004), 4% para *Ae. aegypti* (Lobo *et al.*, 2002), e em alguns casos chega atingir 20 a 43% para a transformação de *An. albimanus* (Perera *et al.*, 2002). No

entanto, é importante salientar que nestes trabalhos, os cálculos para determinar a eficiência na transformação foram baseados em diferentes parâmetros, o que torna impossível a comparação. Em nosso estudo, os cálculos foram baseados nos mesmos parâmetros utilizados por Perera *et al.* (2002) que calcularam a eficiência da transformação de *An. albimanus* a partir do número de famílias férteis e de famílias transgênicas. Desta forma, reportamos que a frequência de transformação de *Ae. fluviatilis* foi de 27%, o que representa uma taxa razoável de eficiência da transformação.

A detecção da linhagem de inseto transgênico é realizada utilizando genes marcadores específicos. Um grande avanço na técnica veio com o uso da proteína verde fluorescente (GFP). Este gene tem a vantagem de ser detectado em todos os estágios de desenvolvimento do mosquito, exceto no ovo. Entretanto, o GFP requer um forte promotor para aumentar sua detecção. Neste estudo, utilizando o marcador EGFP dirigido pelo promotor 3xP3 (Berghamer *et al.*, 1999) foi mostrada a detecção do gene marcador nos olhos, no tubo neural e nas papilas anais, sendo a expressão nos olhos a mais destacada. Nas pupas, a identificação ocorreu através dos olhos do mesmo modo que nos adultos (Fig. 29). Estes resultados corroboram com dados obtidos por outros trabalhos utilizando este promotor para dirigir a expressão do EGFP em tecidos específicos dos insetos (Horn *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2002; Abraham *et al.*, 2005).

Essa detecção em todos os estágios iniciais de desenvolvimento possibilita rapidez e clareza na seleção dos transgênicos *in vivo*, evitando-se assim que os insetos tenham que ser mantidos até a fase adulta para somente depois termos a certeza de serem transgênicos, como ocorria com o marcador de cor de olhos para *Ae. aegypti* (Jasinskiene *et al.*, 1998). Outra vantagem da construção gênica utilizada neste trabalho, é que como o promotor dirige a expressão do gene marcador para determinados tecidos (olhos, tubo neural e papilas anais), é menos provável que o desempenho biológico dos mosquitos seja afetado. Promotores que induzem a expressão do gene ao longo de todo o inseto, como os promotores da poliubiquitina (Handler e Harrell, 1999) e actina (Pinkerton *et al.*, 2000) apresentam a desvantagem de induzirem o acúmulo de proteína exógena em uma grande variedade de tipos celulares reduzindo o desempenho dos mosquitos transgênicos (Marrelli *et al.*, 2006).

Para caracterizar as quatro linhagens de mosquitos *Ae. fluviatilis*

transgênicas, utilizamos diferentes ferramentas. Nós confirmamos a presença de ambos os genes, o marcador e o de bloqueio no genoma dos mosquitos transgênicos por meio da PCR (Fig. 30). Além disso, demonstramos que o gene híbrido foi integrado de forma estável no genoma dos mosquitos *Ae. fluviatilis* transgênicos pela técnica de *Southern Blot* (Fig. 31). Nossos dados corroboram com os resultados obtidos em outros trabalhos com mosquitos transgênicos confirmando a estabilidade de integração do elemento de transposição *piggyBac*, contendo o gene híbrido ao genoma do mosquito (Ito *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Abraham *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2006).

O desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito inicia-se após a alimentação sanguínea quando, dentro de alguns minutos, os gametócitos se transformam em gametas que se fundem para formar o zigoto. Após 24 h, o oocineto móvel invade o epitélio do intestino médio e diferencia-se em oocisto. Duas semanas mais tarde, o oocisto se rompe, liberando milhares de esporozoítos na hemolinfa do mosquito que seguem para invadir a glândula salivar completando seu desenvolvimento (Baton e Ranford-Cartwright, 2004). Desta forma, é importante que o gene de bloqueio expresso pelo mosquito transgênico possa ser secretado, em algum momento do estágio do desenvolvimento do parasita, em locais como o intestino ou glândula salivar para interromper seu desenvolvimento. Neste trabalho, demonstrou-se que o transcrito da PLA<sub>2m</sub> foi detectado majoritariamente em fêmeas de mosquitos antes e após a alimentação sanguínea (Fig. 31) e que o nível de expressão do RNAm deste gene não foi alterado após a alimentação sanguínea (Figs. 32 e 33), perfil muito semelhante ao que ocorre com o RNAm da PLA<sub>2</sub> no intestino de mosquitos *An. stephensi* transgênicos (Abraham *et al.*, 2005).

Para localizar a proteína PLA<sub>2m</sub> no intestino de mosquitos transgênicos foram utilizados anticorpos policlonais específicos. Na maioria dos trabalhos a presença da proteína de bloqueio no mosquito era detectada por imunofluorescência ou imunoblotting (Moreira *et al.*, 2000, Ito *et al.*, 2002; Lobo *et al.*, 2002). Kim *et al.*, (2004) utilizando um promotor da carboxipeptidase de *Ae. aegypti* para direcionar a expressão de cecropina em *An. gambiae* não conseguiram detectar a presença da proteína de bloqueio por imunoblotting (O'Brochta, comunicação pessoal), sugerindo que a proteína possa estar sendo produzida em pequenas quantidades, o que torna difícil sua detecção por este método. Neste trabalho, a localização da proteína de bloqueio foi obtida por meio da microscopia confocal utilizando anticorpos específicos marcados com fluorescência. Observamos que a PLA<sub>2m</sub> estava

distribuída ao longo do intestino dos mosquitos transgênicos 4h após a alimentação sanguínea (Fig. 34, 35 e 36). Além disso, nas famílias 8T e 10T houve também uma marcação pontual nas células do epitélio intestinal. A proteína PLA<sub>2m</sub> que está sendo produzida poderia estar sendo armazenada em vesículas e deveria ser secretada logo após a alimentação sanguínea, assim como ocorre em AgPer1 (Devenport *et al.*, 2004). No entanto esta marcação pontual não foi evidenciada na família 4T. Através de cortes ópticos, evidenciamos que a marcação da proteína no intestino se torna menos intensa da periferia para o centro do tecido, sugerindo que a proteína não esteja sendo secretada diretamente no bolo sanguíneo. Neste trabalho utilizamos um promotor específico de *An. gambiae* em uma espécie muito distante evolutivamente, o *Ae. fluviatilis*. Em anofelinos, as proteínas da matriz peritrófica são produzidas pelas células epiteliais e armazenadas em vesículas que, logo após a alimentação sanguínea, são secretadas para a formação da matriz peritrófica (Devenport *et al.*, 2004). Por outro lado, em *Ae. aegypti* as proteínas são armazenadas na forma de RNAm e quando o mosquito se alimenta de sangue a tradução é disparada (Perrone e Spielman, 1988; Billingsley e Rudin, 1992). Além disso, estudos anteriores demonstravam que a secreção da proteína da matriz peritrófica de *Ae. aegypti*, Ae-APer50, é mais intensa 4h após a alimentação sanguínea (Shao *et al.*, 2005), já em *An. gambiae* a expressão da proteína AgPer14 ocorre antes da alimentação sanguínea (Devenport *et al.*, 2004; 2005). Nossos resultados corroboram com os resultados obtidos por Shao *et al.*, (2005), uma vez que a PLA<sub>2m</sub>, embora fosse dirigida por um promotor de *Anopheles*, foi detectada 4h após a alimentação sanguínea no intestino dos mosquitos transgênicos.

A atividade antiparasítica da PLA<sub>2m</sub> nos mosquitos transgênicos foi verificada por meio de ensaios de bloqueio ao *P. gallinaceum*. Em 13 experimentos independentes pudemos demonstrar que o desenvolvimento de oocistos foi significativamente inibido nas quatro linhagens de mosquitos *Ae. fluviatilis* transgênicos de 17,5 a 68,5% (Tabela 6). Essa diferença entre o bloqueio obtido em nosso estudo quando comparado com bloqueios obtidos quando a enzima ativa foi expressa em *An. stephensi* (84,7 a 98,8% por Moreira *et al.*, 2002 e 74 a 91% por Abraham *et al.*, 2005), pode ser explicada de diversas formas. A primeira se deve ao promotor utilizado, que é específico de *An. gambiae*. Em um trabalho anterior foi demonstrado que o mosquito *Ae. aegypti* e *An. gambiae* guardam uma relação evolucionária distante, compartilhando um ancestral comum há mais de 140 milhões de anos atrás (Service, 1993). Utilizando promotores de *An. gambiae* em

*Ae. aegypti*, Moreira e colaboradores (2000) verificaram que o promotor do anofelino pôde dirigir a expressão de um transgene em *Aedes*, mas com um comportamento diferente da espécie de origem. Possivelmente, os fatores de transcrição de *Ae. aegypti* não reconheçam apropriadamente a seqüência regulatória do promotor de *An. gambiae* o que possivelmente poderia também estar acontecendo em *Ae. fluviatilis* expressando a PLA<sub>2</sub>m. Uma outra possibilidade se deve ao fato de não estarmos trabalhando com mosquitos homozigotos para o transgene. Com uma dupla dose do gene poderíamos esperar um maior conteúdo da proteína de bloqueio e conseqüentemente uma maior inibição do parasita.

Com relação à variação de inibição do *P. gallinaceum* entre as linhagens podemos discutir dois pontos importantes. A variação pode ser devido ao efeito de posição quando houve a integração do transposon (Maragathavally *et al.*, 2006). O *piggyBac* se insere aleatoriamente em sítios TTAA (Fraser *et al.*, 1996) e com isto pode se inserir em regiões regulatórias contendo promotores fortes do mosquito (ou *enhancers*), o que aumentaria a expressão da proteína transgênica. Por outro lado, poderia também reprimir a expressão do transgene, dependendo de onde se inseriu no genoma (Caterruccia *et al.*, 2003). Entretanto outros estudos deveriam ser relacionados para responder essa questão como, PCR inverso, hibridização *in situ*, eletroforese de cromossomos em campo pulsado e posterior hibridização com sondas específicas.

Com relação ao efeito da expressão do gene sobre o desempenho das linhagens transgênicas, dados indiretos mostram que a expressão do gene da PLA<sub>2</sub>m, não acarretou efeito aparente sobre o desempenho dos mosquitos transgênicos. Atualmente estamos na 15<sup>o</sup> geração de mosquitos transgênicos mantendo a proporção de 50% de mosquitos selvagens e 50% de mosquitos transgênicos mesmo que o acasalamento seja aleatório. Um outro trabalho está em andamento para avaliar o desempenho (*fitness*) dos mosquitos transgênicos.

Este estudo é de grande importância para ampliar o conhecimento de moléculas alternativas para o bloqueio de espécies de *Plasmodium*, uma vez que devido à grande plasticidade deste parasita (Gardner *et al.*, 2002), somente um gene não será suficiente para bloquear completamente seu desenvolvimento. Possivelmente, a utilização de vários genes de bloqueio seria uma estratégia para aumentar o nível de inibição, bloqueando o parasita no intestino e possivelmente nas glândulas salivares (utilizando um promotor específico daquele órgão, por exemplo). Além disso, a manipulação genética de mosquitos possibilita uma extensa gama de

estudos relacionados à interação *Plasmodium*/mosquito, o que pode abrir grandes possibilidades na pesquisa de doenças transmitidas por mosquitos vetores, nas condições brasileiras. No entanto, outras estratégias além da transgenia devem ser utilizadas em conjunto para o controle da malária.

## CONCLUSÕES

---

---

---

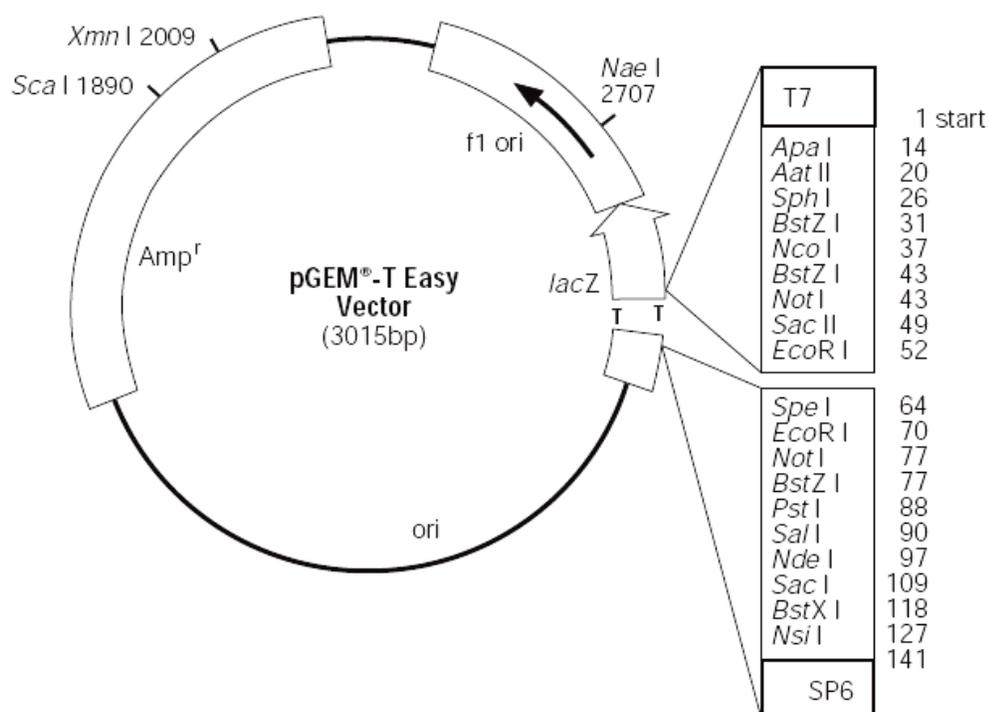
## 7. CONCLUSÕES

- O peptídeo antimicrobiano gomesina inibiu o crescimento intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* e das formas sexuadas de *P. berghei* e *P. falciparum*.
- A proteína PLA<sub>2m</sub> recombinante inibiu o desenvolvimento de *P. gallinaceum* em mosquitos *Aedes fluviatilis* selvagens, quando adicionada ao sangue infectado.
- O elemento de transposição *piggyBac* se mostrou funcional para uso na transgenia de mosquitos *Ae. fluviatilis*.
- O promotor da matriz peritrófica de *An. gambiae* (AgPer1) dirigiu a expressão do gene de bloqueio (PLA<sub>2m</sub>) em mosquitos transgênicos
- O padrão de expressão do gene marcador (EGFP), dirigido pelo promotor 3xP3, foi semelhante ao das outras espécies de mosquitos já transformadas.
- O RNAm da PLA<sub>2m</sub> foi produzido especificamente no intestino de mosquitos transgênicos, estando presente antes e após o repasto sanguíneo.
- A proteína de bloqueio (PLA<sub>2m</sub>) foi detectada exclusivamente em intestinos de mosquitos transgênicos, por meio da microscopia confocal.
- Linhagens de mosquitos transgênicos expressando a PLA<sub>2m</sub> bloquearam significativamente a produção de oocistos de *P. gallinaceum*.

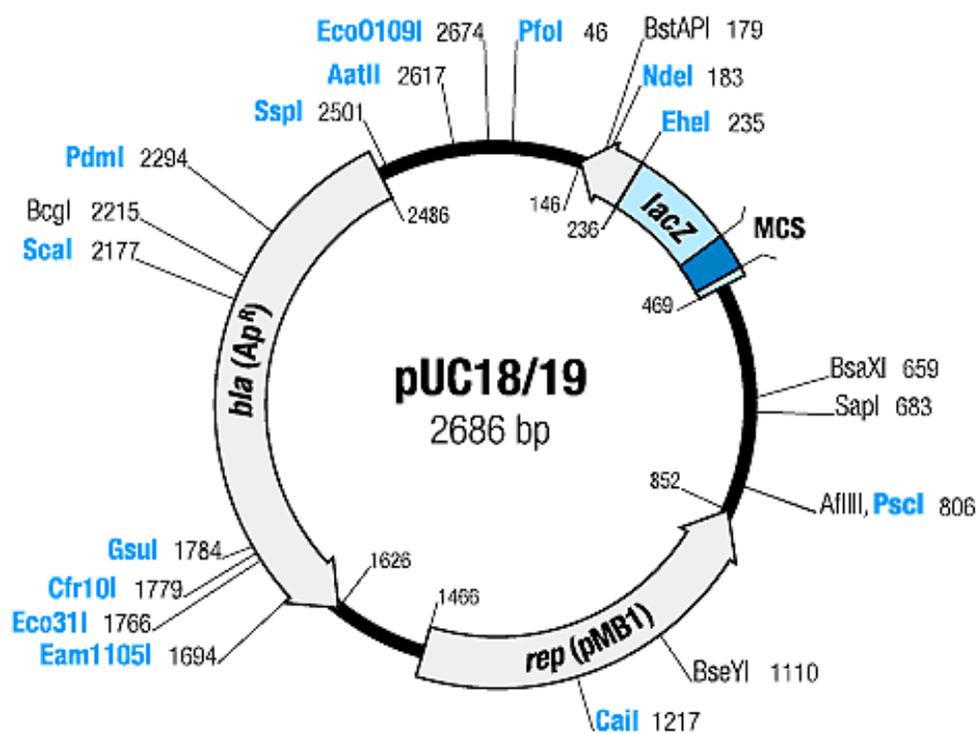
## ANEXO 1 – MAPA DOS PLASMÍDEOS

---

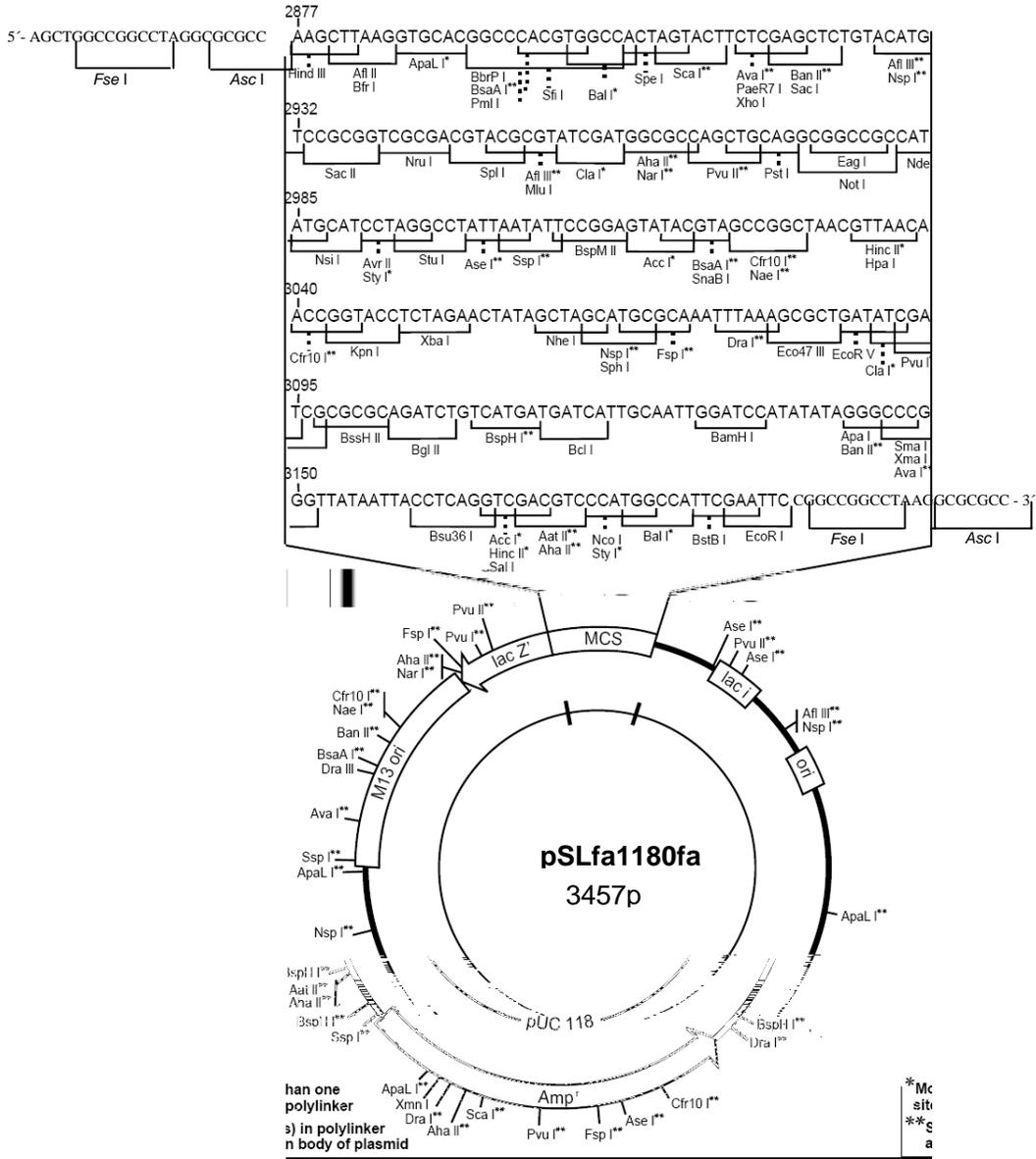
---



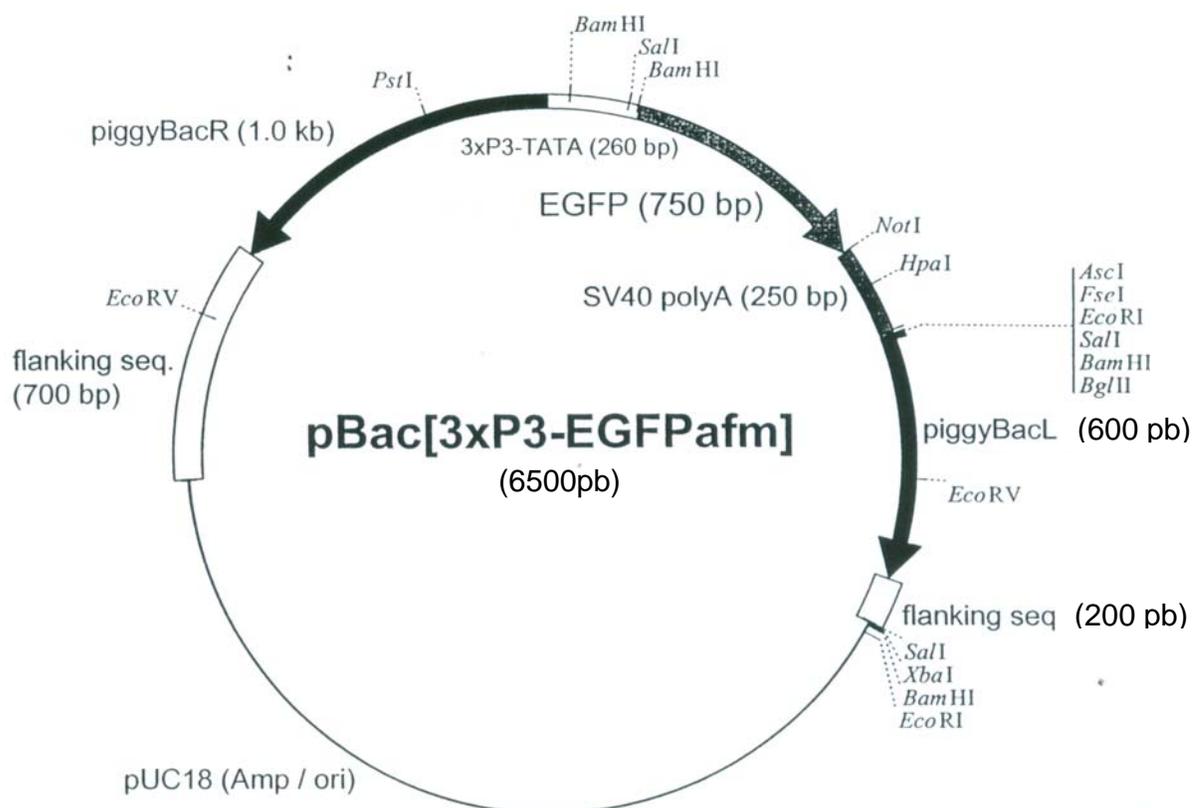
Representação esquemática do mapa do plasmídeo de clonagem pGem-T easy: Ori- origem de replicação, Lac Z:  $\alpha$ -peptídeo-região codificadora da  $\beta$ - galactosidase; T7 e SP6: promotores da RNA polimerase que flanqueiam uma região múltipla de clonagem, T: local de inserção da molécula de DNA exógeno, f1 ori: região f1 fago, Amp: gene que confere resistência à ampicilina. Adaptado Promega.



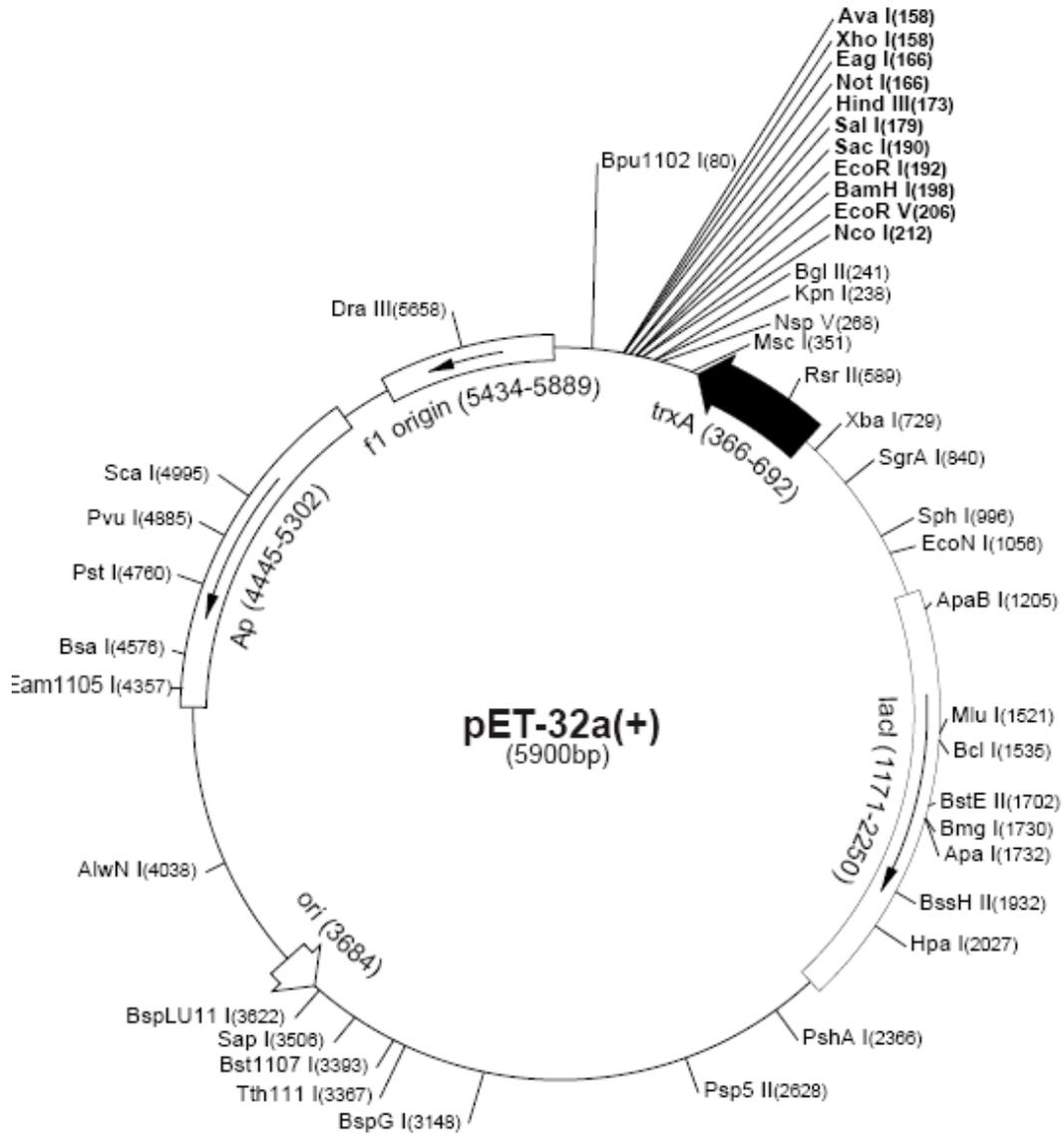
Representação esquemática do mapa do plasmídeo pUC19. Adaptado do site: <http://www.ferramentas.com/techinfo/nucleicacids/mappuc1819.htm>.



Representação esquemática do plasmídeo (*shuttle*) pSLfa1180fa. Adaptado do site: <http://www.amershambiosciences>.



Representação esquemática do mapa do vetor *piggyBac* {pBac [3xP3-EGFPafm]}. Os braços esquerdo e direito do elemento de transposição na figura são representados por “piggyBacL” e “piggyBacR”, respectivamente; EGFP, proteína verde fluorescente melhorada (Horn e Wimmer, 1999).



Representação esquemática do vetor de expressão pET32a(+). Adaptado Novagen.

## ANEXO 2 – ARTIGOS

---

---

**Artigo 1 - Publicado**

Germline transformation of *Aedes fluviatilis* (Díptera: Culicidae) with the piggyBac transposable element

**Flávia Guimarães Rodrigues**, Sabrina Barbosa Oliveira, Bruno Coelho Rocha, Luciano Andrade Moreira

Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Vol. 101 (7): 755-757, 2006.

# Germline transformation of *Aedes fluviatilis* (Diptera:Culicidae) with the *piggyBac* transposable element

Flávia Guimarães Rodrigues, Sabrina Barbosa Oliveira, Bruno Coelho Rocha, Luciano Andrade Moreira<sup>+</sup>

Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil

*The technique to generate transgenic mosquitoes requires adaptation for each target species because of aspects related to species biology, sensitivity to manipulation and rearing conditions. Here we tested different parameters on the microinjection procedure in order to obtain a transgenic Neotropical mosquito species. By using a transposon-based strategy we were able to successfully transform Aedes fluviatilis (Lutz), which can be used as an avian malaria model. These results demonstrate the usefulness of the piggyBac transposable element as a transformation vector for Neotropical mosquito species and opens up new research frontiers for South American mosquito vectors.*

Key words: transgenic mosquitoes - *piggyBac* - malaria

The insertion of foreign genes into the genome of an organism is an important tool to address the expression of a particular gene, to study parasite-vector interactions and also for practical uses. The first stable transformation of a mosquito was achieved by Coates et al. (1998) and by Jasinskiene et al. (1998) who expressed a species-specific eye colour gene, in *Aedes aegypti* (Linnaeus). A great achievement was obtained with the use of the green fluorescent protein (GFP), as a selective marker, because it has the advantage to express in a variety of species, including insects (Pinkerton et al. 2000, Horn & Wimmer 2000, Catteruccia et al. 2000, Kokoza et al. 2001), and on early developmental stages. Furthermore, with the discovery that the transposon *piggyBac* was able to work in different organisms [insects (Handler & Harrell 1999, Handler & MacCombs 2000, Grossman et al. 2001, Peloquin et al. 2000, Tamura et al. 2000, Ito et al. 2002, Moreira et al. 2002, Kim et al. 2004, Franz et al. 2006) and even in mouse (Ding et al. 2005), planaria (Gonzalez-Estevéz et al. 2003), and *Plasmodium falciparum* (Balu et al. 2005)], a wide horizon has opened on the transformation of insects of both agricultural and medical/veterinary importance.

Although several mosquito species have been transformed so far, there are differences related to each species and consequently, adaptation of the transformation technique is required.

*Aedes fluviatilis* (Lutz) is a zoophilic and anthropophilic species, with a geographical distribution comprehending the Southern part of Mexico to the Northern part of Argentina, east of Andes. This species has been used

in laboratory as a safe avian malaria vector (Tason de Camargo & Krettli 1978), as it does not naturally transmit dengue or yellow fever.

Here we report the first successful stable transformation of *Ae. fluviatilis*, by using the *piggyBac* transposable element, being the first report of genetically manipulation of mosquitoes in Latin America.

## MATERIALS AND METHODS

*Ae. fluviatilis* mosquitoes were reared at 27°C and 80% humidity under a 12 h light/dark cycle. For adults, 10% sucrose solution was offered *ad libitum* and females were fed on mouse blood. Larvae were fed on fish food (Goldfish Colour, Alcon).

The transformation plasmids [*piggyBac* 3xP3-EGFP (Horn & Wimmer 2000) and *phsp*-Helper plasmid] were purified by using a Plasmid Maxi-Prep kit (Qiagen). Plasmids were mixed to a final concentration of 0.3 µg/µl (*piggyBac*) and 0.2 µg/µl (Helper plasmid) in injection buffer (5 mM KCl, 0.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.8) plus 5% (vol/vol) of green food colour to help visualization of injection mixture.

Three days old females were fed on mouse blood and two days after, eggs were collected by forced egg laying. Thirty to 45 min embryos were lined up with their posterior ends towards the same side onto a square of filter paper soaked with isotonic buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.2), the filter paper was dried-up and the embryos were transferred to a glass slide containing double-sided tape and covered with halocarbon oil 27 (Sigma-Aldrich).

Microinjections were performed by using a Femtojet injector (Eppendorf) and an inverted microscope (TS100, Nikon) attached to a micromanipulator (Narishige). Microinjection parameters were: 600 hPa (injection pressure); 100 hPa (back pressure) and manual control of injection time. Quartz capillaries were pulled on a laser-based puller (Sutter) using the following pulling parameters: Heat = 750, Fil = 4, Vel = 40, Del = 125, Pull = 125 and the tip was broken by touching the first embryo to be injected.

Surviving injected larvae were maintained in filtered

Financial support: TDR/WHO (grant A20741)  
FG Rodrigues, BC Rocha, and LA Moreira: CNPq research scholarships; SB Oliveira: Fapemig research scholarship  
<sup>+</sup>Corresponding author: luciano@cpqrr.fiocruz.br  
Received 25 July 2006  
Accepted 28 August 2006

tap water until adulthood. Injected males were mated with colony-originated females and injected females with colony counterparts forming injected G0 families. Four egg batches were collected from each family and the larvae screened on a FITC-fluorescence microscope (Nikon TS-100F). Transgenic lines expressing the EGFP marker were crossed with colony insects for expansion. EGFP specific oligonucleotides (EGFP<sub>for</sub>: 5'-ggtgcccatcctggtcgagc-3' and EGFP<sub>rev</sub>: 5'-gctgctcacgaactccagcagg-3') were used to identify the presence of the transgene with the following polymerase chain reaction (PCR) (95°C 2 min, 30 cycles of 95°C 1 min, 63°C 1 min and 72°C 1 min, followed by 72°C, 5 min).

### RESULTS AND DISCUSSION

In order to adapt the microinjection technique, which has been used to other Culicidae species we tested different parameters to obtain the best larval hatching after the microinjection procedure and consequently, to increase the chances of transformation. First, we have tested the possibility of maintaining the embryos on ice to reduce embryo aging and consequently to expand the injection time, but that procedure drastically reduced larval hatching even in control embryos, which were not injected (data not shown). We tested post-injection manipulations of mosquito embryos, in order to obtain higher larval hatching. We compared the transference of embryos to a damp filter paper with the use of a fine paintbrush prior to transfer the eggs to water or by dipping the slide containing

eggs in ddH<sub>2</sub>O three times, to remove oil excess. The highest larval hatching was obtained when the slide containing eggs was dipped in water to remove oil excess and the embryos were transferred to a Petri dish filled with water and with filter paper on its border.

With the 84 adults that survived microinjection, 15 G0 families were formed and after screening of more than 17,000 larvae (G1), four transgenic lines were obtained (Table), resulting in a transformation frequency of 27%, based on G0 families. Fig. 1A shows the typical phenotypic characteristic of transformed mosquitoes with the use of 3xP3 promoter (Horn & Wimmer 2000) when driving the expression of EGFP. Larval, pupal and adult eyes, larval neural tube and larvae anal papillae exhibits a strong green fluorescence [similar to previously shown for *Ae. aegypti* (Kokoza et al. 2001) and for *Anopheles stephensi* (Liston) (Ito et al. 2002)], which is detectable even on first instar larvae. The presence of the EGFP gene in transgenic larvae is shown on Fig. 1B, by PCR, in comparison to non-transformed individuals.

This work shows the functionality of the *piggyBac* transposable element, as a transformation vector, in another mosquito species. Our findings open new possibilities to genetic manipulate South American mosquito species to better understand their interaction with parasites they transmit, in our particular conditions. Work is in progress in adapting this technology to transform a Brazilian malaria vector, *Anopheles aquasalis* (Curry), which shall express a *Plasmodium*-blocking molecule.

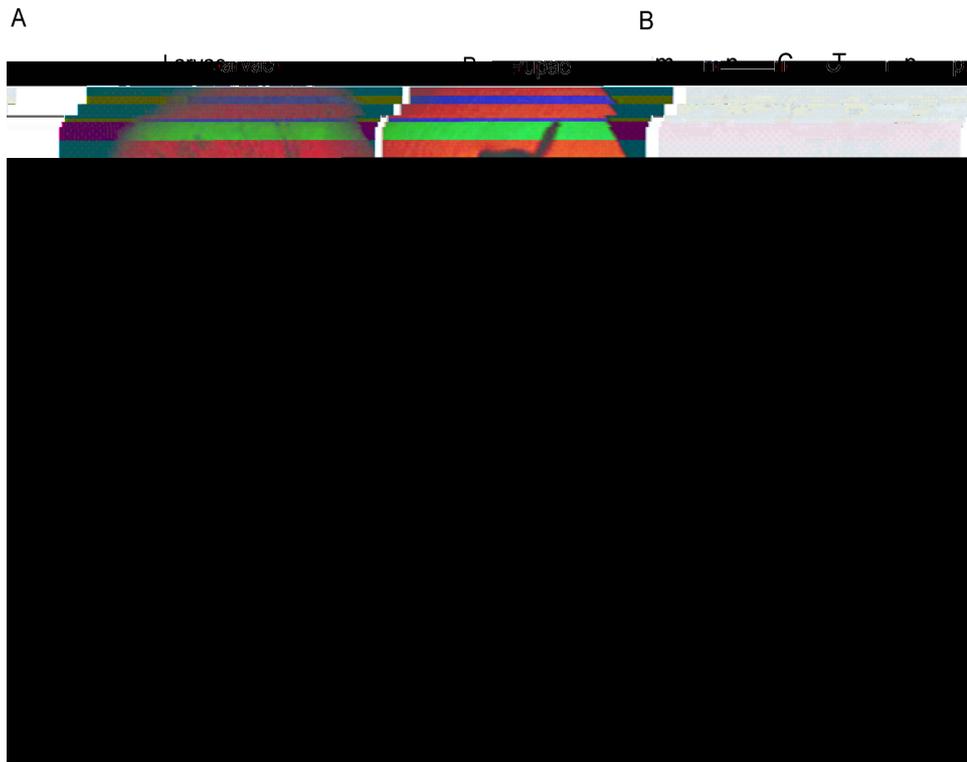


Fig. 1: expression of the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene in transgenic *Aedes fluviatilis*. A: larvae and pupae of both transgenic (T) and non-transgenic mosquitoes (C); B: ethidium bromide stained 1% agarose gel, showing the amplification of the EGFP gene, by polymerase chain reaction, with EGFP specific primers; m: DNA marker (New England Biolabs 100 pb); n: no DNA added; C: non-transgenic larvae; T: transgenic larvae; p: *piggyBac* 3xP3/EGFP DNA.

TABLE

Number of injected embryos, surviving adults, number of transgenic families and transformation frequency in *Aedes fluviatilis*

Experiment <sup>a</sup>	Embryos (n)	Larvae (% hatch) <sup>b</sup>	Surviving adults	Fertile families	Transgenic (GFP) families	Transformation frequency <sup>c</sup>
Control 1	254	140 (100)	n/d	n/d	-	-
Control 2	236	83 (64)	n/d	n/d	-	-
Injected	770	108 (25)	84	15	4	27%

*a*: control 1 are embryos that were collected and directly placed in water for hatching. Control 2 were embryos submitted to all procedures before injection (see text), but not injected; *b*: for larval hatching calculation, Control 1 embryos were considered as 100% hatching; *c*: transformation frequency was calculated based on fertile families; n/d: numbers not determined.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr Marcelo Jacobs-Lorena, who kindly provided us the transformation plasmids. To Maira S Neves and Geraldo F Carvalho for their great technical support and Cristiana FA Brito for critical reading.

## REFERENCES

- Balu B, Shoue DA, Fraser Jr MJ, Adams JH 2005. High-efficiency transformation of *Plasmodium falciparum* by the lepidopteran transposable element *piggyBac*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16391-16396.
- Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A 2000. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* 405: 959-962.
- Coates CJ, Jasinskiene N, Miyashiro L, James AA 1998. Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3748-3751.
- Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T 2005. Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* 12: 473-483.
- Franz AWE, Sanchez-Vargas I, Adelman ZN, Blair CD, Beaty BJ, James AA, Olson KE 2006. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4198-4203.
- Gonzalez-Estevez C, Momose T, Gehring WJ, Salo E 2003. Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye-specific GFP marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14046-14051.
- Grossman GL, Rafferty CS, Clayton JR, Stevens TK, Mukabayire O, Benedict MQ 2001. Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the *piggyBac* transposable element. *Insect Mol Biol* 10: 597-604.
- Handler AM, Harrell RA 1999. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. *Insect Mol Biol* 8: 449-457.
- Handler AM, McCombs SD 2000. The *piggyBac* transposon mediates germ-line transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome. *Insect Mol Biol* 9: 605-612.
- Horn C, Wimmer EA 2000. A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev Genes Evol* 210: 630-637.
- Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M 2002. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* 417: 452-455.
- Jasinskiene N, Coates CJ, Benedict MQ, Cornel AJ, Rafferty CS, James AA, Collins FH 1998. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3743-3747.
- Kim W, Koo H, Richman AM, Seeley D, Vizioli J, Klocko AD, O'Brochta DA 2004. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. *J Med Entomol* 41: 447-455.
- Kokoza V, Ahmed A, Wimmer EA, Raikhel AS 2001. Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the *piggyBac* transposable element vector pBac [3xP3-EGFP afm]. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 1137-1143.
- Moreira LA, Ito J, Ghosh A, Devenport M, Zieler H, Abraham EG, Crisanti A, Nolan T, Catteruccia F, Jacobs-Lorena M 2002. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J Biol Chem* 277: 40839-40843.
- Peloquin JJ, Thibault ST, Staten R, Miller TA 2000. Germ-line transformation of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) mediated by the *piggyBac* transposable element. *Insect Mol Biol* 9: 323-333.
- Pinkerton AC, Michel K, O'Brochta DA, Atkinson PW 2000. Green fluorescent protein as a genetic marker in transgenic *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 9: 1-10.
- Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P, 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat Biotechnol* 18: 81-84.
- Tason de Camargo M, Krettli AU 1978. *Aedes fluviatilis* (Lutz), a new experimental host for *Plasmodium gallinaceum* Brumpt. *J Parasitol* 64: 924-925.

## **Artigo 2 - Publicado**

Mosquitos transgênicos – Possível arma contra a malária

**Flávia Guimarães Rodrigues** e Luciano Andrade Moreira

Ciência Hoje, Vol. 39 (232): 34-39, 2006.

# Mosquitos

FOTOS CEDIADAS PELOS AUTORES

*A malária é uma das principais doenças endêmicas em áreas tropicais. Como ainda não existe uma vacina e as tentativas de controle do mosquito transmissor têm sido infrutíferas, a única opção para os infectados, hoje, está nos medicamentos contra o parasita causador da doença. Os cientistas, porém, já buscam outros caminhos, e um deles é o desenvolvimento de mosquitos geneticamente modificados, capazes de impedir que os protozoários responsáveis pela malária se instalem em seu organismo, o que interromperia o ciclo de transmissão. Esse tipo de pesquisa já está sendo feita no Brasil.*

Flávia Guimarães Rodrigues (doutoranda)  
e Luciano Andrade Moreira  
Laboratório de Malária,  
Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz

# transgênicos

## Possível arma contra a malária

A malária, causada por protozoários do gênero *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malarieae*, na infecção humana, no Brasil), é uma doença milenar, relatada já na antiga China e no Império Romano. Hoje, a doença causa a morte de mais de 1 milhão de pessoas por ano no mundo, principalmente crianças de até cinco anos, e é típica de países tropicais de todos os continentes, mas o maior número de casos ocorre na África. No Brasil, foram registrados no ano passado quase 601 mil casos, com cerca de 80 mortes, sendo a grande maioria em estados da Amazônia, segundo o Ministério da Saúde (figura 1).

Os sintomas mais comuns da malária são febre, calafrios, vômitos, suor frio e dor de cabeça. A doença é transmitida para o homem por meio da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados com o parasita. Apenas a fêmea desses mosquitos, chamados de vetores da doença, alimenta-se de sangue ▶

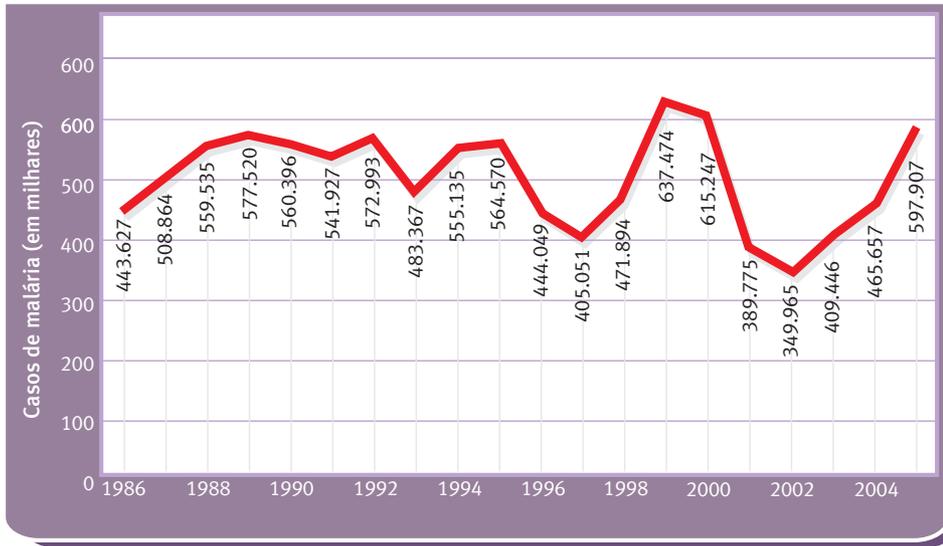


Figura 1. Casos de malária registrados em todo o Brasil, entre 1986 e 2005 – parte das alterações observadas de ano para ano pode ser atribuída a variações na cobertura do sistema de saúde (quanto ao diagnóstico da doença)

(necessário para a produção de seus ovos) – os machos consomem basicamente nectar de flores. Ao picar uma pessoa com malária, a fêmea suga, junto com o sangue, as formas do parasita chamadas de gametócitos, as quais evoluem dentro do intestino do inseto e geram outras formas (esporozoitos), que migram para suas glândulas salivares. Esse ciclo no interior do mosquito dura cerca de 15 dias, e as fêmeas que já contêm esporozoitos poderão transmitir a doença, através de sua saliva, ao picar uma pessoa sadia.

A transmissão é mais comum no interior das habitações de áreas rurais e semi-rurais, mas pode ocorrer em áreas urbanas, principalmente em locais periféricos, onde existem condições ambientais propícias às espécies de *Anopheles*, mais comuns em regiões silvestres. O risco de infecção é pequeno em áreas situadas a mais de 2 mil m de altitude, onde essas espécies raramente ocorrem. Na região amazônica, a principal espécie vetora é o *Anopheles darlingi*, que se reproduz em grandes corpos de água limpa (lagoas, represas, remansos de rios). Já na faixa litorânea predomina o *Anopheles aquasalis*, que se reproduz em água salobra. Outras espécies desse gênero, entre elas *A. albitarsis*, *A. deaneorum*, *A. cruzii* e *A. bellator*, também podem transmitir a doença. Tais mosquitos estão mais ativos à noite, do crepúsculo ao amanhecer, e geralmente picam as pessoas dentro das habitações. Nas cidades são mais comuns os mosquitos dos gêneros *Culex* (o pernilongo comum) e *Aedes* (o transmissor da dengue).

Ao picar uma pessoa sadia em busca de sangue, o mosquito infectado inocula os esporozoitos junto com a saliva. Essas formas circulam no sangue e, ao chegar ao fígado, invadem células do fígado, nas quais sofrem novas transformações e se

multiplicam. Rompem então as células hospedeiras e, já na forma de merozoítos, retornam à corrente sanguínea e invadem as hemácias (glóbulos vermelhos ou eritrócitos). Nestas, os parasitas passam por mais um ciclo de desenvolvimento e multiplicação, que termina com o rompimento de grande número de hemácias e a liberação de mais merozoítos no sangue – esse fenômeno provoca as febris cíclicas da doença (a cada 48 a 72 horas, dependendo da espécie do parasita). Os merozoítos liberados passam a invadir outras hemácias, causando anemia e, eventualmente, a morte do indivíduo infectado (mais comum na infecção por *P. falciparum*).

O tratamento da malária é realizado com medicamentos destinados a eliminar os plasmódios, mas o surgimento de resistência a essas drogas, por parte dos parasitas, tem reduzido sua eficácia. O combate aos mosquitos vetores é feito com inseticidas, mas também já existem populações de mosquitos resistentes aos produtos aplicados. Além disso, muitos grupos de pesquisa, em todo o mundo, vêm tentando desenvolver uma vacina contra a malária, mas um produto eficiente ainda não está disponível. Tais fatos, associados ao crescimento desordenado de populações em áreas endêmicas, às migrações, aos desmatamentos e à falta de saneamento básico, vêm contribuindo para o aumento de casos de malária no Brasil.

## Outra opção: mudar o mosquito

Em função de todos esses problemas, há mais de 20 anos cientistas imaginaram outro modo de reduzir a transmissão dessa doença: alterar geneticamente o mosquito para torná-lo um vetor menos eficiente. A ideia é inserir, no genoma do mosquito, um ou mais genes que determinem a produção, em seu organismo, de compostos (uma proteína, por exemplo) que impeçam o desenvolvimento do para-

FONTE: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE

sita da malária. Liberados na natureza, após rigorosos testes de segurança, os mosquitos transgênicos (ou geneticamente modificados, já que têm um ou mais genes de outras espécies) se disseminariam entre as populações silvestres desses insetos e, aos poucos, conteriam a transmissão da doença.

As tentativas realizadas por diferentes pesquisadores utilizaram várias técnicas de modificação genética, entre elas a de microinjeção em embriões, muito comum nos estudos com a mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*). Essa técnica emprega elementos de transposição (chamados de transposons) para ‘carregar’ as seqüências de DNA que se quer inserir no genoma do mosquito. Os transposons têm, como os vírus, a capacidade de se incorporar em determinados genomas e, com isso, fazer com que as células de seu ‘hospedeiro’ cumpram as tarefas determinadas pela seqüência introduzida. Ao se incorporar ao DNA de um organismo, eles (mesmo quando não carregam uma seqüência capaz de determinar alguma tarefa) podem interferir com a expressão de genes (aumentando, reduzindo ou até impedindo essa expres-

são). Para dar uma ideia da capacidade dos transposons, basta lembrar que cerca de 40% do genoma humano é composto por seqüências desses elementos, embora a grande maioria esteja inativa.

Na técnica da microinjeção, uma mistura de DNA injetada, com uma agulha, no embrião do mosquito. Esse embrião – um ovo de mosquito recém-colocado pela fêmea, usado até duas horas após a postura. Os embriões são alinhados com ajuda de uma lupa e um pincel para que todos fiquem na mesma posição (os ovos têm uma parte anterior, que dará origem à cabeça da larva, e uma posterior, que se tornará a cauda) e depois transferidos para uma lâmina de microscópio contendo uma fita adesiva. Os ovos são grudados nessa fita e cobertos com óleo para que não ressequem, já que, na natureza, ovos de mosquitos ficam na água.

Com a ajuda de um microscópio mais potente, um microinjetor (equipamento que injeta ar sob alta pressão) usado para lançar a mistura de DNA na parte posterior do embrião, pois a intenção é inserir a seqüência de DNA escolhida no material genético de células sexuais do inseto (figura 2). A ▶

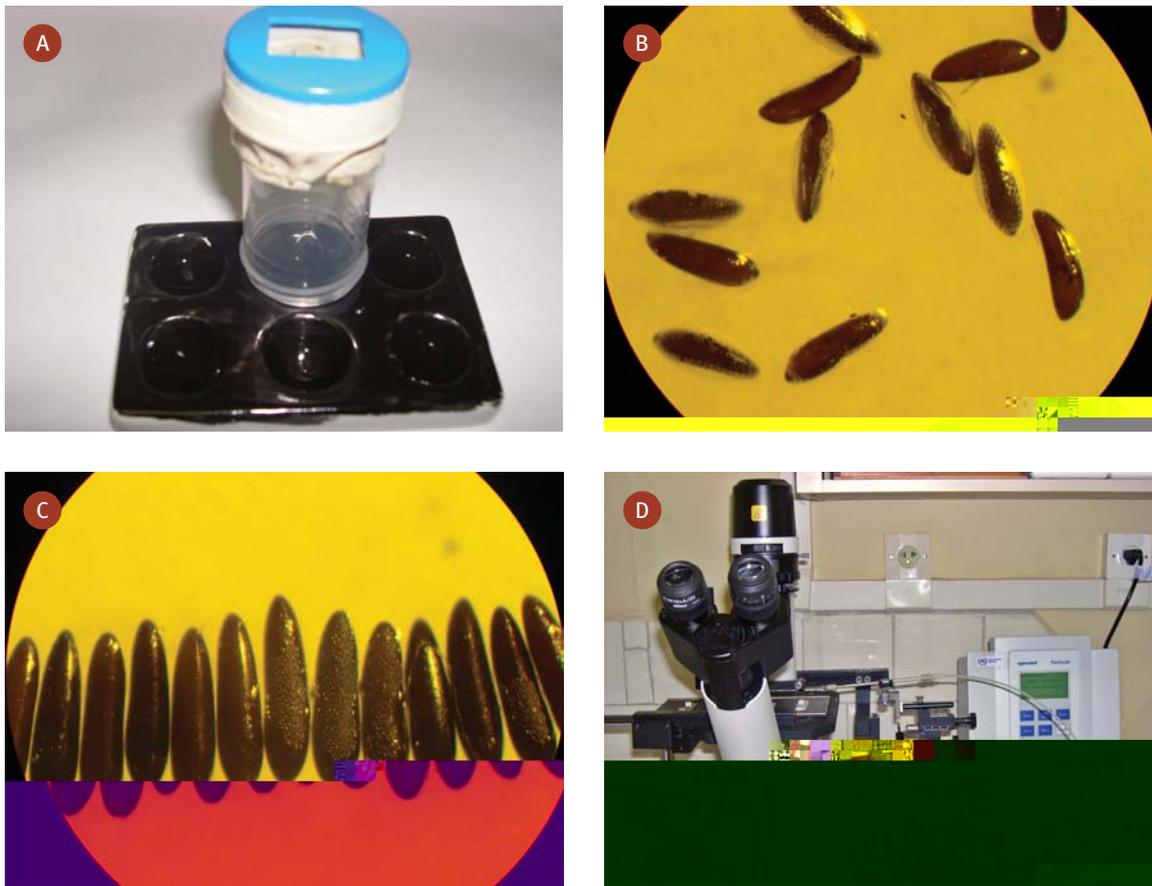


Figura 2. Metodologia para microinjeção em mosquitos *Aedes fluviatilis* (vetor da malária em galinhas): na primeira etapa, as fêmeas realizam a postura forçada de ovos (A); na segunda, os ovos são coletados após 30 min (B) e alinhados com a ajuda de lupa (C); em seguida, é feita a microinjeção de seqüências de DNA nos embriões (D).

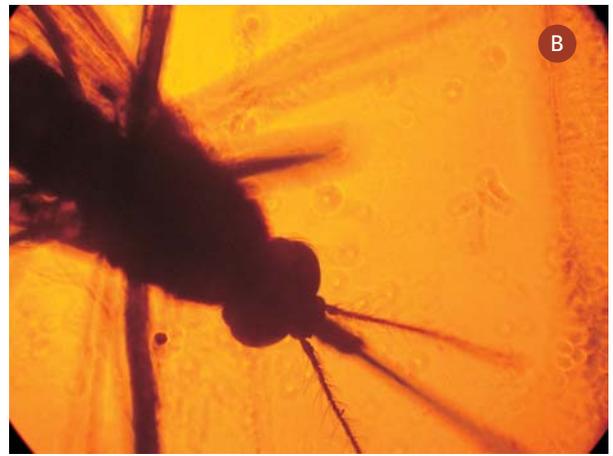
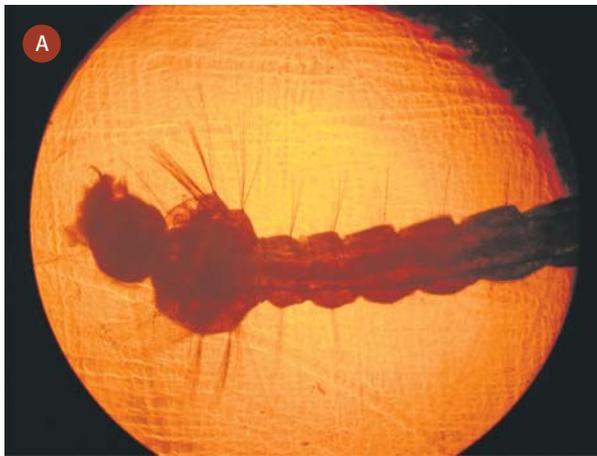


Figura 3. Os mosquitos transgênicos são identificados através de imagens, obtidas com microscópio de fluorescência (com aumento de 40 vezes), de larvas e mosquitos adultos (crias dos insetos que receberam a microinjeção de DNA): a larva (A) e o mosquito adulto (B) selvagens têm olhos normais, enquanto a larva (C) e o mosquito adulto (D) transgênicos exibem olhos verdes nesse microscópio.

seqüência precisa se incorporar a essas células para que o mosquito possa transferi-la aos seus descendentes – o que fará dele um inseto transgênico. Após a microinjeção os ovos são recolocados em água e espera-se cerca de três dias para o nascimento das larvas. Essas larvas ainda não são consideradas transgênicas, pois não se sabe se conseguirão passar o gene inserido para seus descendentes. Cerca de 10 dias depois as larvas tornam-se mosquitos adultos, machos ou fêmeas, e estes são cruzados com adultos (que não passaram pela microinjeção) da colônia mantida no laboratório.

Os ovos produzidos a partir dos acasalamentos originarão larvas que podem ou não ser transgênicas. Isso é verificado através de um ‘gene marcador’, inserido junto com o gene de interesse para o combate à malária. Esse segundo gene determina a produção de uma proteína fluorescente (conhecida pela sigla EGFP), e para verificar se ele está incorporado ao genoma da larva (o que indica que o gene de interesse também está lá) é usado outro microscópio, que emite luz fluorescente. Se uma larva apresentar olhos verdes e pontos verdes brilhantes em seu dorso, é transgênica. A olho nu e em um microscópio normal, por fim, essas larvas são idênticas às outras.

É importante lembrar que esse evento não é frequente. Em nossa pesquisa, no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou, em Belo Horizonte (MG), chegamos a observar quase oito mil larvas para encontrar uma transgênica. Entre-

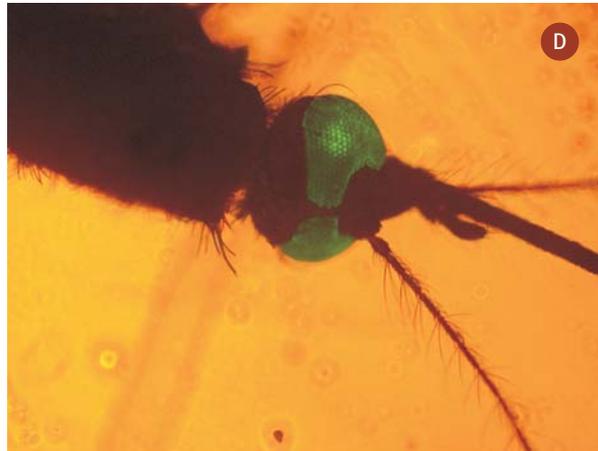
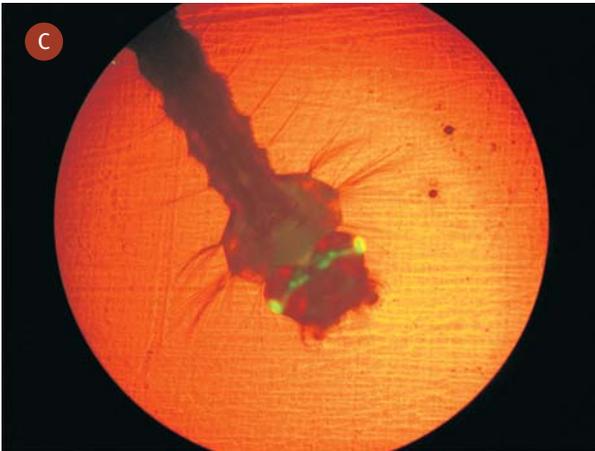
tanto, a partir do momento que uma larva transgênica é identificada, outras aparecem na mesma família, e o cruzamento desses adultos transgênicos com adultos da colônia permite estabelecer o que é chamado de linhagem transgênica, que se torna estável pelas gerações subsequentes (figura 3).

Para tentar interromper o ciclo do parasita da malária dentro do mosquito, outro gene, chamado de gene de bloqueio, é inserido em seu genoma. Em nossa pesquisa utilizamos um gene que determina a produção de uma proteína, presente no veneno das abelhas e capaz de, como mostrou outro grupo de pesquisadores, bloquear o plasmódio quando este se encontra no intestino do mosquito. Esse gene é ligado, por técnicas laboratoriais, a seqüências de DNA do próprio mosquito relacionadas à produção das enzimas digestivas necessárias ao processamento do sangue que ele ingere, e essas seqüências são microinjetadas nos embriões.

Assim, quando a produção dessas enzimas for ativada no mosquito, a proteína de bloqueio também será produzida e lançada em seu intestino, impedindo o desenvolvimento do parasita da malária. Com isso, o plasmódio não conseguirá chegar às glândulas salivares do mosquito e este, teoricamente, não conseguirá transmiti-lo para um ser humano ou um animal.

## Insetos transgênicos em estudo

Nosso grupo obteve, até o momento, quatro linhagens transgênicas de mosquitos, que estão sendo testadas para a verificação do grau de bloqueio do parasita da malária de galinhas (*Plasmodium gallinaceum*), já que a espécie de mosquito (*Aedes fluviatilis*) geneticamente transformada não permite



trabalhar com parasitas de humanos. Essa espécie foi utilizada porque é mais seguro trabalhar com um parasita que não afeta o ser humano. Além disso, é mais difícil criar em laboratório os mosquitos vetores da malária humana, que também são mais sensíveis à microinjeção. No entanto, nosso grupo já está iniciando pesquisas com o *Anopheles aquasalis*.

Nos testes de bloqueio realizados em nosso laboratório, mosquitos adultos (transgênicos e não transgênicos) em uma gaiola são alimentados com sangue de galinha infectada com malária. Após uma semana os insetos são separados e seus intestinos são retirados, contando-se o número de parasitas ali encontrados. A contagem é feita com base nos chamados oocistos, formados no intestino dos mosquitos quando os gametócitos do sangue ingerido evoluem para formas sexuais e ocorre a fertilização. Esses estudos ainda estão em andamento, e espera-se que os mosquitos que produzam a proteína de bloqueio (os transgênicos) tenham menos oocistos (parasitas) do que os selvagens.

As pesquisas para transformar geneticamente espécies de mosquitos vetores de malária humana exigem maior segurança no laboratório, já que existe o risco de transmissão da doença, se algum mosquito infectado escapar das gaiolas. Nosso grupo já obteve anofelinos transgênicos, e agora pretende testar o grau de bloqueio de plasmídios humanos nesses insetos. Para isso, os mosquitos serão alimentados com sangue de pessoas infectadas com malária, através de um alimentador artificial, onde os insetos precisam 'picar' uma membrana (como se fosse a pele humana) para obter o sangue. O conjunto mantido a 37°C, temperatura semelhante à do corpo humano. A contagem dos oocistos seguirá a mesma metodologia adotada nos estudos já realizados.

A obtenção de mosquitos transgênicos ainda é um primeiro passo dentro da pesquisa maior, que

é multidisciplinar e envolverá entomologistas, ecólogos, estatísticos, epidemiologistas e agentes de saúde. Outros estudos, visando ao bloqueio de malária e dengue nos mosquitos transmissores, foram desenvolvidos em países da Europa e nos Estados Unidos, mas todos se mantiveram no nível de laboratório. No Brasil, esta é a primeira vez que mosquitos transmissores de malária são modificados geneticamente. A técnica é muito promissora, pois também permite estudar as interações entre o parasita e o vetor. Essa linha de pesquisa, uma vez implantada nos países, poderá ser usada com vetores de outras doenças, como a dengue, ou mesmo a doença de Chagas, transmitida pelos percevejos conhecidos como barbeiros.

As pesquisas com mosquitos transgênicos estão sendo realizadas em laboratório e todos os cuidados são tomados para evitar que essas primeiras linhagens de insetos transgênicos sejam liberadas acidentalmente na natureza. Mesmo com os benefícios que eventualmente trariam para a população humana, esses mosquitos modificados não poderão ser soltos após diversos estudos que verifiquem se eles terão, no ambiente natural, o mesmo desempenho e a mesma capacidade de reprodução e sobrevivência que os indivíduos das populações selvagens, podendo competir com eles na busca de alimento e abrigo e na geração de descendentes. O ideal seria que os transgênicos mostrassem alguma vantagem nessa concorrência, pois isso aumentaria a rapidez com que o gene de bloqueio se espalharia nessas populações.

Acreditamos que o desenvolvimento e a utilização de mosquitos transgênicos no combate à malária é uma alternativa que precisa ser explorada. Esses insetos não seriam empregados como um método isolado, mas em combinação com outras medidas de controle, como drogas contra o parasita, inseticidas e mesmo junto com uma vacina, quando esta estiver à disposição. ■

#### SUGESTÕES PARA LEITURA

- MOREIRA, L. A.; GHOSH, A. K.; ABRAHAM, E. G.; JACOBS-LORENA, M. 'Genetic transformation of mosquitoes: a quest for malaria control', in *International Journal for Parasitology*, v. 32, p. 1.599, 2002.
- HANDLER, A. M. & JAMES, A. A. (eds.) *Insect transgenesis: methods and applications*, Boca Raton, CRC Press, 2000.

**Artigo 3 - In Press**

Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium* spp.

Cristina K. Moreira, **Flávia G. Rodrigues**, Anil Ghosh, Fernando de P. Varotti, Antônio Miranda, Sirlei Daffre, Marcelo Jacobs-Lorena, Luciano A. Moreira

Experimental Parasitology (2007)



## Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium* spp.

Cristina K. Moreira <sup>a,1,2</sup>, Flávia G. Rodrigues <sup>b,2</sup>, Anil Ghosh <sup>a</sup>, Fernando de P. Varotti <sup>b</sup>, Antonio Miranda <sup>c</sup>, Sirlei Daffre <sup>d</sup>, Marcelo Jacobs-Lorena <sup>a</sup>, Luciano A. Moreira <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Microbiology and Immunology, John Hopkins Bloomberg School of Public Health, Malaria Research Institute, 615 North Wolfe Street, Baltimore, MD 21205, USA

<sup>b</sup> Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte-MG CEP 30190-002, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, Rua Três de Maio, 100, São Paulo-SP CEP 04044-020, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo-SP CEP 05508-900, Brazil

Received 4 October 2006; received in revised form 25 January 2007; accepted 31 January 2007

### Abstract

While seeking strategies for interfering with *Plasmodium* development in vertebrate/invertebrate hosts, we tested the activity of gomesin, an antimicrobial peptide isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. Gomesin was tested against asexual, sexual and pre-sporogonic forms of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* parasites. The peptide inhibited the *in vitro* growth of intraerythrocytic forms of *P. falciparum*. When gomesin was added to *in vitro* culture of *P. berghei* mature gametocytes, it significantly inhibited the exflagellation of male gametes and the formation of ookinetes. *In vivo*, the peptide reduced the number of oocysts of both *Plasmodium* species in *Anopheles stephensi* mosquitoes, and did not appear to affect the mosquitoes. These properties make gomesin an excellent candidate as a transmission blocking agent for the genetic engineering of mosquitoes.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Index Descriptors and Abbreviations:** Antimicrobial peptide; Gomesin; Malaria; Mosquito; Ookinete; Oocyst; Exflagellation; GFP, green fluorescent protein; *P. berghei*, *Plasmodium berghei*; *P. falciparum*, *Plasmodium falciparum*; *An. stephensi*, *Anopheles stephensi*; RPMI-1640, Roswell Park Memorial Institute medium; *t*-Boc, *tert*-butyloxycarbonyl; MR4, Malaria Research and Reference Reagent Resource Center; ATCC, American Type Culture Collection; FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz

### 1. Introduction

Over 3 billion inhabitants of tropical regions are at risk for malaria. According to the World Health Organization, at least 500 million people contracted malaria in 2004, resulting in more than 3 million deaths. Although usually

curable and preventable, the incidence of malaria cases is expanding as parasites developed resistance to the most commonly used drugs, and mosquitoes became resistant to insecticides (WHO, 2005). The search for new anti-malarial drugs and the development of alternative strategies of disease control are crucial to successfully decrease morbidity, mortality, and transmission.

Several naturally occurring antimicrobial peptides have been tested as potential anti-*Plasmodium* agents, including scorpion, dermaseptin S3 and S4, magainin 2, cecropin B, and defensin (Gwadz et al., 1989; Shahabuddin et al., 1998; Ghosh et al., 1997; Conde et al., 2000), as well as synthetic peptides, e.g. Vida 1-3, P2WN, ILF, SM1, SB-37,

\* Corresponding author. Fax: +1 55 31 3295 3115.

E-mail address: luciano@cpqrr.fiocruz.br (L.A. Moreira).

<sup>1</sup> Present address: Weill Medical College of Cornell University, Department of Microbiology and Immunology, 1300 York Avenue, Box 62, New York, NY 10021, USA.

<sup>2</sup> These authors contributed equally to this work.

and Shiva-1 and 3 (Jaynes et al., 1988; Rodriguez et al., 1995; Possani et al., 1998; Ghosh et al., 2001; Arrighi et al., 2002). These peptides have a broad spectrum of action and permeate cell membranes by incompletely understood mechanisms. The lipid composition and the charge of the target cell membrane influence their activity, making it possible to selectively target pathogens but not their host cells. For example, studies with dermaseptin S4 derivatives demonstrated that antimicrobial peptides can be engineered to act specifically on the membrane of intracellular parasites, with the anti-*Plasmodium* effect of the original peptide being mediated by host cell lysis (Dagan et al., 2002; Efron et al., 2002). This is an important achievement since it demonstrates the potential use of antimicrobial peptides as chemotherapeutic agents for malaria treatment as well as other intracellular pathogens.

Strategies for interfering with *Plasmodium* development in the mosquito, such as transmission blocking vaccines, paratransgenesis, and transgenic mosquitoes, have been proposed as alternative methods to control malaria (Riehle et al., 2003). Proof of concept that transgenic mosquitoes can be used to block parasite transmission has been demonstrated (Ito et al., 2002; Moreira et al., 2002; Kim et al., 2004; Abraham et al., 2005). In addition to the antimicrobial peptides mentioned above, anti-*Plasmodium* effector candidates include anti-circumsporozoite (CS) antibody and phospholipase-A<sub>2</sub> (de Lara Capurro et al., 2000; Zieler et al., 2001). Because most of these agents are only partially effective, and because parasites readily overcome agents that interfere with their survival, it is imperative that multiple transmission-blocking effector molecules be used simultaneously. The search for additional, highly active, effector molecules is an important goal toward the implementation of mosquito-blocking strategies.

The antimicrobial peptide gomesin, isolated from the hemocytes of the tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent agent against different strains of bacteria, filamentous fungi, and yeast, as well as *Leishmania amazonensis* (Silva et al., 2000). Here we report on the evaluation of gomesin as an anti-*Plasmodium*

of movement in 5 random microscope fields at 400× magnification after 10 min incubation at room temperature. The IC<sub>50</sub> value was calculated by the Origin version 5.0 software (Microcal Software, Inc.).

### 2.5. *In vitro* activity of gomesin on the ability of gametocyte cultures to develop to ookinetes

*Plasmodium berghei* mature gametocytes were cultured *in vitro* as described (Sinden et al., 1985). Briefly, gametocyte-positive mouse blood was collected by heart puncture and immediately submitted to a five-fold dilution in RPMI 1640 (Gibco, USA), pH 7.5, containing 25 mM Hepes, 2 mM glutamine, 1 μM xanthurenic acid, 0.37 mM hypoxanthine and 0.2% sodium bicarbonate. Ninety microliters of diluted blood were added to wells of a 96-well microtiter plate and incubated for 16 h at 20 °C, for ookinete formation. Various concentrations of gomesin in a volume of 10 μL were added at the beginning of the culture (time zero) and 4 and 8 h later. The number of ookinetes per 10,000 red blood cells was determined, 16 h after the beginning of the ookinete culture with the use of a hemocytometer, under 400× magnification.

### 2.6. Evaluation of *Plasmodium* oocyst formation after gomesin-enriched blood meal

Individual *P. berghei* gametocyte-positive mice were used to infect control mosquitoes. Immediately after this feeding, the different mice were injected with 200 μL of different concentrations of gomesin into the tail vein, to obtain the final concentration of 0–200 μM of peptide in the mouse blood. In order to calculate the amount of gomesin to inject, we assumed that the mouse circulating blood is 8% of its weight, and expected to have the peptide equally distributed in the blood (Hoff, 2000). The oocysts were counted at day 15 and the inhibitory effect was calculated [(mean oocyst number per gut of mosquitoes fed on gomesin-injected mouse)/(mean oocyst number per gut of mosquitoes fed on the mouse prior to gomesin injection) × 100] and the numbers were compared between control and gomesin exposed mosquitoes fed on the same mouse.

*Plasmodium falciparum* NF54 stage V gametocytes mixed with 0–200 μM gomesin were membrane fed to mosquitoes, and oocysts were counted in mercurochrome-stained midguts, 8 days after feeding. The inhibitory effect was calculated as (mean oocyst number per gut of mosquitoes fed on gomesin)/(mean oocyst number per gut of mosquitoes fed on 1× PBS) × 100.

### 2.7. Effect of gomesin on the fitness of *An. stephensi* mosquitoes

Three-day-old female *An. stephensi* were membrane fed with mouse blood mixed with 0, 25 or 200 μM gomesin. Engorged females were separated and placed in 500 mL

paper cups (2 females per cup, 30 cups per treatment) and 10% sucrose was offered *ad libitum*. The number of dead mosquitoes was recorded daily. Egg collections in moist paper filter-lined small plastic cups were set up 2 d after the blood meal. Eggs were collected after an additional 2 d, counted and placed in water for hatching. The number of larvae was counted 5 d after hatching.

### 2.8. Statistical analysis

The effect of gomesin on oocyst formation was analyzed with the non-parametric Mann–Whitney test for *P. berghei* and the *t*-test for *P. falciparum*. The Kruskal–Wallis non-parametrical test was used to analyze the data of gomesin effects on mosquitoes.

## 3. Results

### 3.1. Effect of gomesin on *Plasmodium* asexual erythrocytic forms

The effect of gomesin on *P. falciparum* intraerythrocytic stage proliferation was studied by the radioactive hypoxanthine incorporation method, which is directly correlated with parasite growth. Gomesin inhibited parasite development of both chloroquine-sensitive (3D7-GFP) and chloroquine-resistant (W2) parasites (Fig. 1). The calculated IC<sub>50</sub> values ranged from 75.8 (W2) to 86.6 μM (3D7-GFP) in independent experiments. By comparison, the IC<sub>50</sub> for artesunate, used as a positive control, ranged from 5.1 nM (3D7-GFP) to 25 nM (W2).

### 3.2. Effect of gomesin on *Plasmodium* pre-sporogonic stages

The effect of gomesin on *P. berghei* sexual and pre-sporogonic stages was determined through *in vitro* experiments. As shown in Table 1, gomesin significantly inhibited male gamete exflagellation. At 50 μM the peptide promoted approximately 58% reduction in the exflagellation of *P. berghei* male gametes, and 68% inhibition was obtained with 100 μM. However, 100 μM linear (inactive) gomesin (Fazio et al., 2006) or 1× PBS used to solubilize the peptide had no inhibitory effect (data not shown). The calculated IC<sub>50</sub> value is 46.8 μM, which is about half of the calculated concentration for asexual intraerythrocytic forms.

To determine the effect of gomesin on ookinete formation, *P. berghei* gametocyte cultures were incubated in the presence of different concentrations of the peptide. Gomesin was added at three different time points (0, 4, and 8 h after the beginning of the culture) and inhibition was scored 16 h later (Table 2). When gomesin was added at the beginning of culture, 12.5 μM inhibited 50–100% ookinete formation, while 25 μM inhibited 67–100% and 50 μM led to 100% inhibition. When gomesin was added 4 or 8 h after the beginning of the culture, 75% inhibition or higher was observed with 12.5 μM, and 100% and 75–100% mortality with 50 μM, at 4 and 8 h, respectively. Although

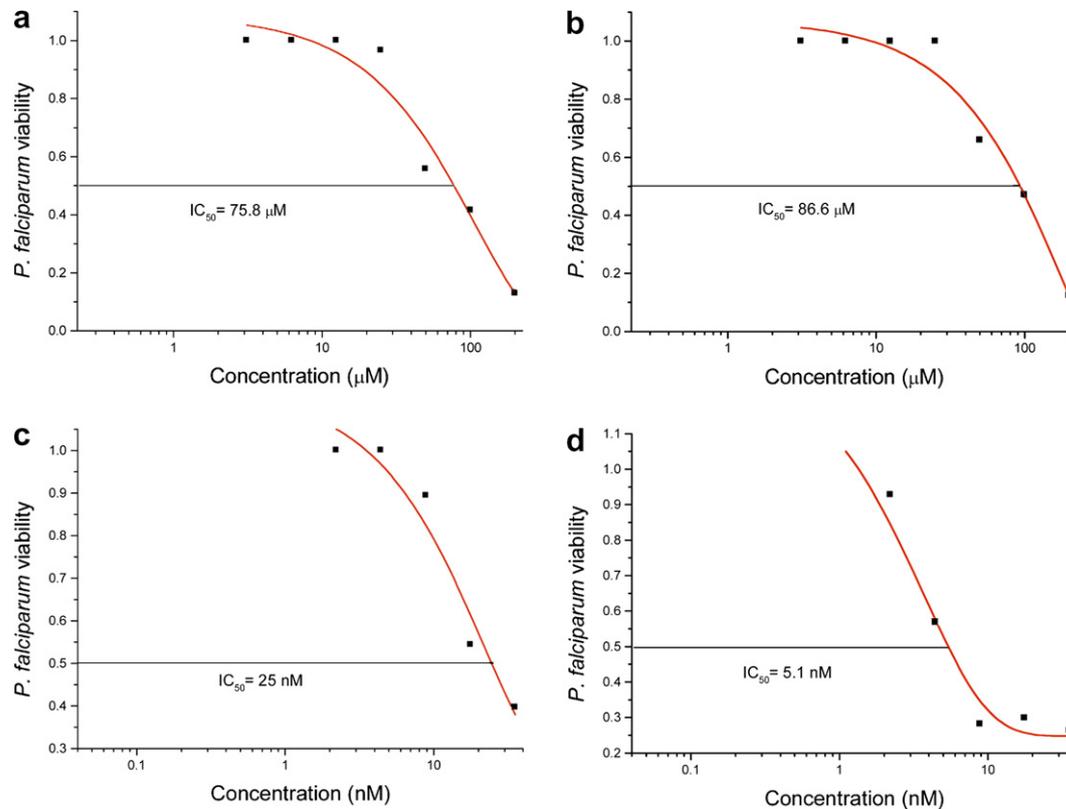


Fig. 1. Dose–response curves of parasite viability in the presence of gomesin (a and b; in  $\mu\text{M}$ ) and artesunate (c and d; in  $\text{nM}$ ) for *in vitro* cultures of the *P. falciparum* lines W2 (a and c) and 3D7-GFP (b and d). Data are representative of three independent experiments using artesunate as a control, and two independent experiments with gomesin, each experiment done in triplicate.

Table 1  
*In vitro* effect of gomesin on *P. berghei* male exflagellation

Gomesin concentration ( $\mu\text{M}$ )	No. of exflagellations/No. of microscope fields					Average % inhibition
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	
0	146/5	200/5	246/5	108/5	81/5	0
6.25	135/5	154/5	170/5	96/5	78/5	18.9
12.5	135/5	120/5	156/5	85/5	68/5	27.7
25	123/5	101/5	90/5	74/5	68/5	41.6
50	79/5	64/5	82/5	59/5	42/5	58.2
100	74/5	43/5	61/5	49/5	21/5	68.2

Gametocyte-positive mouse blood was diluted and incubated for 10 min at  $20^\circ\text{C}$  in the presence of gomesin, as described in Section 2. Exflagellation was scored by counting centers of movement in 5 random microscope fields ( $400\times$  magnification). Data from five independent experiments.

gomesin impaired *P. berghei* early sporogonic stage development we were unable to pinpoint if it targets all the stages between gametes and mature ookinetes. It is well known that *Plasmodium* development varies between parasite species and the mosquito vector, but in general, at 0 h after an infectious blood meal, one expects to see gametocytes and gametes within the mosquito midgut, at 4 h zygotes and at 8 h immature ookinetes should be present (Baton and Ranford-Cartwright, 2005).

### 3.3. *Plasmodium* oocyst reduction after gomesin-enriched blood meal

To check whether the addition of gomesin to the mosquito blood meal would reflect on reduction of oocyst

numbers we tested the peptide in two different systems. *An. stephensi* mosquitoes were blood fed before (control) and after injection of gomesin into the tail vein of a *P. berghei* infected mouse. As shown in Table 3, gomesin-enriched blood meal resulted in *P. berghei* oocyst reduction. At  $50\ \mu\text{M}$ , the average number of oocysts per midgut was 53% lower than the control, whereas 86% inhibition was achieved when  $100\ \mu\text{M}$  was given to the mouse. Gomesin also inhibited *P. falciparum* oocyst formation;  $50\ \mu\text{M}$  reduced oocysts formation by 56% while complete blockage was obtained with  $100\ \mu\text{M}$  (Table 4). It is important to emphasize that lower number of oocysts could be reflected by the action of gomesin towards earlier parasite stages (gametes, zygotes and/or ookinetes).

Table 2  
*In vitro* effect of gomesin on the formation of *P. berghei* ookinetes

	Gomesin concentration ( $\mu\text{M}$ )	Number of ookinetes/ 10,000 RBC (% inhibition)		
		Gomesin added 0 h after the start	Gomesin added 4 h after the start	Gomesin added 8 h after the start
Exp. 1	0	21	24	20
	12.5	10 (54%)	6 (75%)	4 (80%)
	25	7 (67%)	6 (75%)	2 (90%)
	50	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
Exp. 2	0	16	15	16
	12.5	4 (75%)	1 (93%)	0 (100%)
	25	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
	50	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
Exp. 3	0	4	4	4
	12.5	0 (100%)	1 (75%)	1 (75%)
	25	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
	50	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
Exp. 4	0	23	22	23
	50	0 (100%)	0 (100%)	5 (78%)
Exp. 5	0	17	15	17
	50	0 (100%)	0 (100%)	2 (88%)

Gametocyte-positive mouse blood was placed in culture and gomesin was added at 0, 4 and 8 h after the start of gametogenesis. The number of ookinetes per 10,000 red blood cells (RBC) was determined, after 16 h of the start of the culture, with the use of a hemocytometer, under 400 $\times$  magnification. Data from five independent experiments.

Table 3  
*In vivo* inhibition of *P. berghei* oocyst formation by gomesin

Exp.	Gomesin concentration	Oocysts per midgut <sup>a</sup>	Oocyst-positive mosquitoes <sup>b</sup>	% Oocyst inhibition
1	25 $\mu\text{M}$	72.1 (0–225)	93.3 (14/15)	45
	Control	131.4 (0–352)	91.7 (11/12)	
2	50 $\mu\text{M}$	14.5 (0–162)*	65.6 (21/32)	53
	Control	30.8 (0–122)	83.3 (25/30)	
3	50 $\mu\text{M}$	74.4 (0–244)*	94.1 (16/17)	80
	Control	375.8 (190–592)	100 (5/5)	
4	100 $\mu\text{M}$	2.4 (0–14)**	40 (14/35)	86
	Control	17.6 (0–72)	85.7 (30/35)	
5	200 $\mu\text{M}$	85.3 (3–188)*	100 (11/11)	69
	Control	274 (95–510)	100 (5/5)	
6	200 $\mu\text{M}$	19.2 (0–92)*	97 (33/34)	70
	Control	65.7 (0–284)	81.3 (26/32)	

For each experiment, control *An. stephensi* mosquitoes were fed on anaesthetized *P. berghei*-infected mouse. A second group of experimental mosquitoes was fed on the same mouse about 10 min after injection of gomesin into its tail vein. Mosquitoes were kept at 21 °C and the number of oocysts per midgut was determined on day 15. Data from six independent experiments.

<sup>a</sup> Mean oocyst number per mosquito midgut. The range of observed values is indicated in parentheses.

<sup>b</sup> Percentage of mosquitoes that had oocysts in their midgut. These values were derived from the number of oocyst-positive mosquitoes over the total number of mosquitoes examined (shown in parentheses).

\*  $p < 0.05$  in comparison to the control by the Mann–Whitney test.

\*\*  $p < 0.0001$  in comparison to the control by the Mann–Whitney test.

### 3.4. Effect of gomesin on mosquito fitness

To analyze the effect of gomesin on mosquito fitness, female *An. stephensi* mosquitoes were fed mouse blood containing different concentrations of the peptide through an artificial membrane. Fitness was determined by measuring mosquito survival, fecundity (egg laying), and fertility (larvae production). Gomesin had no effect on female survival. Gomesin did not affect fecundity nor fertility at

50  $\mu\text{M}$ , but at 200  $\mu\text{M}$  it decreased fertility by approximately 50% and significantly reduced larval production (Table 5).

## 4. Discussion

In this study we analyzed the effect of the antimicrobial peptide gomesin, on the development of the malaria parasite, to address its possible utility as either a new therapeutic

Table 4  
*In vivo* inhibition of *P. falciparum* oocyst formation by gomesin

Gomesin concentration ( $\mu\text{M}$ )	Oocysts per midgut <sup>a</sup>	Oocyst-positive mosquitoes <sup>b</sup>	% Oocyst inhibition
Control	23 $\pm$ 23 (0–99)	78.8 (41/52)	—
25	17 $\pm$ 21 (0–89)*	63.4 (33/52)	26
50	10 $\pm$ 12 (0–51)**	71.2 (37/52)	56
100	0.5 $\pm$ 1.2 (0–5)**	25 (13/52)	99.9
200	0**	0 (0/52)	100

*Plasmodium falciparum* stage V gametocytes mixed with gomesin were membrane fed to *An. stephensi* mosquitoes. Mosquitoes were kept at 26 °C and the number of oocysts per midgut was determined on day 8.

<sup>a</sup> Mean oocyst number per mosquito midgut. The range of observed values is indicated in parentheses.

<sup>b</sup> Percentage of mosquitoes that had oocysts in their midgut. These values were derived from the number of oocyst-positive mosquitoes over the total number of mosquitoes examined (shown in parentheses).

\*  $p < 0.05$  in comparison to the control by the *t*-test.

\*\*  $p < 0.0001$  in comparison to the control by the *t*-test.

Table 5  
 Effect of gomesin on the fitness of *An. stephensi* female mosquitoes

Gomesin concentration (number of mosquitoes)	Survival (mean number of days $\pm$ SD)	Eggs (mean $\pm$ SD)	Larvae (mean $\pm$ SD)
0 $\mu\text{M}$ ( $n = 31$ )	23.7 $\pm$ 4.2	72.6 $\pm$ 34	43.3 $\pm$ 32.6
50 $\mu\text{M}$ ( $n = 30$ )	26.9 $\pm$ 6	57.7 $\pm$ 23.5	33.9 $\pm$ 21
200 $\mu\text{M}$ ( $n = 30$ )	24.9 $\pm$ 6	27.1* $\pm$ 15.6	5.5* $\pm$ 5.4

Female mosquitoes were membrane-fed on mouse blood containing different concentrations of gomesin and the mean and standard deviation of mosquito survival, fecundity (number of eggs) and fertility (number of larvae) were recorded. Control mosquitoes ('0') were artificially fed on mouse blood mixed with the same volume of 1 $\times$  PBS.

\* Statistically significant difference of means compared to control using the Kruskal–Wallis test ( $p < 0.0001$ ).

tic agent and/or as an effector molecule for expression in transgenic mosquitoes. Gomesin inhibited the growth of intraerythrocytic forms of two different *P. falciparum* lines, with an  $\text{IC}_{50}$  of 76–87  $\mu\text{M}$ . Lysis of red blood cells was observed when gomesin was added to the cultures. A recent study reported that at a gomesin concentration of 1  $\mu\text{M}$  the hemolysis rate is 16%, and reaches approximately 40% when the concentration is raised to 100  $\mu\text{M}$  (Fazio et al., 2006). It is not known whether gomesin kills the malaria parasite by direct interaction with its membrane, or indirectly by lysis of the host cell. Due to its hemolytic activity, further *in vivo* assays should be done in order to evaluate the potential of this peptide as an anti-malarial drug.

The frog skin antimicrobial peptide, dermaseptin S4, lyses *Plasmodium*-infected erythrocytes at a 30-fold-lower concentration than it lyses non-infected cells (Dagan et al., 2002). Within the blood malaria parasites modify the erythrocyte surface and cytoplasm, displaying parasite-encoded receptors and solute channels on the erythrocyte surface (Templeton and Deitsch, 2005), and this could explain the different susceptibility of infected versus non-infected cells to dermaseptin S4. It is possible that the same observation is valid for gomesin activity; however this hypothesis still has to be investigated.

Gomesin also impaired the development of *Plasmodium* sexual and early sporogonic stages *in vitro* and *in vivo*. Under *in vitro* conditions we observed an inhibition of male gamete exflagellation, and a parasitocidal effect towards ookinetes. However, we were unable to compare the blocking efficiencies towards different pre-sporogonic stages because it is not possible to rule out a cumulative effect

from gametes through ookinetes. Similar studies with other antimicrobial peptides reported different inhibitory effects on distinct *Plasmodium* sexual stages for a fixed peptide concentration (Conde et al., 2000; Arrighi et al., 2002), likely due to changes in the repertoire of surface proteins (Carter and Kaushal, 1984; Kaushal and Carter, 1984), and possibly changes in lipid composition during parasite development, as described in other protozoa (Buscaglia et al., 2004). Exchange of surface lipids or proteins can alter the surface charges and hydrophobicity of cells, thus affecting the activity of antimicrobial peptides (Powers and Hancock, 2003). We believe that the action mechanism of gomesin is through the permeabilization of *Plasmodium* membrane, as previously determined for the parasites *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. (S. Daffre, unpublished data). In the *in vivo* experiments, mosquitoes fed with infected blood containing gomesin developed fewer oocysts or none. The reduced number of oocysts can be probably attributed to fewer ookinetes formed, although a direct effect on oocysts should not be ruled out. Although high variation in oocyst number has been observed in all experiments, this is consistent with results of previous studies which deal with *Plasmodium* oocysts in mosquitoes (Bhatnagar et al., 2003; Kim et al., 2004; Shahabuddin et al., 1995, 1998; Zieler et al., 1999, 2001).

To further determine its use as a transmission blocking agent, we investigated the effect of gomesin on some fitness parameters of adult female anophelines. Gomesin did not increase mosquito mortality; 50  $\mu\text{M}$  had no deleterious effect on mosquito fecundity and fertility, whereas 200  $\mu\text{M}$  significantly reduced egg laying and larval survival.

The concentration of endogenous antimicrobial peptides in the hemolymph of immune activated insects ranges from 1 to 100  $\mu\text{M}$  (Hetru et al., 1998), and this compares with the gomesin concentrations used in our anti-parasite experiments. The cationic nature of gomesin suggests that its affinity to prokaryotic membranes is higher than to eukaryotic cell membranes (Silva et al., 2000). We will test more physiologically relevant levels between 50 and 200  $\mu\text{M}$  to determine where the effect begins, and may use these data to somehow limit expression in transgenic mosquitoes.

The broad effect of gomesin on the mosquito stages of *Plasmodium*, and its low toxicity to mosquitoes when administered *per os*, make this peptide an interesting candidate to be expressed in the midgut of genetically engineered mosquitoes, driven by blood-meal induced midgut promoters such as carboxypeptidase (AgCP) or peritrophic matrix protein 1 (AgAper 1) (Edwards et al., 1997; Abraham et al., 2005). The latter, which encodes a peritrophic matrix protein, can direct the secretion of transgenic proteins immediately upon mosquito blood feeding (Devenport et al., 2004). Other antimicrobial peptides were successfully expressed within the hemolymph or midgut of transgenic mosquitoes. The *Aedes aegypti* defensin, when driven by the fat body promoter vitelogenin was present within the insect hemolymph up to three weeks after a blood meal and when extracted from transgenic mosquitoes inhibited the growth of the bacteria *Micrococcus luteus* (Kokoza et al., 2000). Cecropin A from *Anopheles gambiae* was over-expressed in this mosquito species by using the *Ae. aegypti* carboxypeptidase promoter and was able to significantly reduce *Plasmodium berghei* oocyst numbers (Kim et al., 2004).

Assuming that gomesin had already effect towards early ookinetes (Table 2) and based on the parasite life cycle on mosquito midgut, there is a relatively broad timing (from minutes up to 24 h post infective blood meal) that gomesin could work as an anti-parasitic molecule, when present within the insect midgut lumen.

In conclusion, gomesin is a promising anti-*Plasmodium* effector candidate for expression in transgenic mosquitoes to be added to the arsenal of other effector molecules.

## Acknowledgments

We thank Thomas Richie for providing us access to the Malaria Service Group at the Biological Research Institute, Rockville, MD, and Patricia De La Vega, Thomas Mitchell and Teresa Ponio for excellent assistance on *P. falciparum* assays. Marcos A. Fázio for gomesin synthesis, and Martin Devenport and Luzia Carvalho for important discussions. We also thank MR4 for providing us with PfHDGFP parasite (MRA-317) contributed by K. Haldar. This investigation received financial support from the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), grant ID A20791, and from the National Institutes of Health. FGR and

LAM received scholarships from the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

## References

- Abraham, E.G., Donnelly-Doman, M., Fujioka, H., Ghosh, A., Moreira, L., Jacobs-Lorena, M., 2005. Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with AgAper1 regulatory elements. *Insect Molecular Biology* 14, 271–279.
- Arrighi, R.B., Nakamura, C., Miyake, J., Hurd, H., Burgess, J.G., 2002. Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malarías. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46, 2104–2110.
- Baton, L.A., Ranford-Cartwright, L.C., 2005. Spreading the seeds of million-murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. *Trends in Parasitology* 21, 573–580.
- Bhatnagar, R.K., Arora, N., Sachidanand, S., Shahabuddin, M., Keister, D., Chauhan, V.S., 2003. Synthetic propeptide inhibits mosquito midgut chitinase and blocks sporogonic development of malaria parasite. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304, 783–787.
- Buscaglia, C.A., Campo, V.A., Di Noia, J.M., Torrecilhas, A.C., De Marchi, C.R., Ferguson, M.A., Frasch, A.C., Almeida, I.C., 2004. The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. *Journal of Biological Chemistry* 279, 15860–15869.
- Carter, R., Kaushal, D.C., 1984. Characterization of antigens on mosquito midgut stages of *Plasmodium gallinaceum*. III. Changes in zygote surface proteins during transformation to mature ookinete. *Molecular and Biochemical Parasitology* 13, 235–241.
- Conde, R., Zamudio, F.Z., Rodriguez, M.H., Possani, L.D., 2000. Scorpion, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Letters* 471, 165–168.
- Dagan, A., Efron, L., Gaidukov, L., Mor, A., Ginsburg, H., 2002. In vitro anti-*Plasmodium* effects of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46, 1059–1066.
- de Lara Capurro, M., Coleman, M.J., Beerntsen, B.T., Myles, K.M., Olson, K.E., Rocha, E., Kretzli, A.U., James, A.A., 2000. Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoe-513.II.hf 304,hi62(,)-5p7

- display peptide library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13278–13281.
- Gwadz, R.W., Kaslow, D., Lee, J.Y., Maloy, W.L., Zasloff, M., Miller, L.H., 1989. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Infection and Immunity* 57, 2628–2633.
- Hetru, C., Hoffmann, D., Bulet, P., 1998. Antimicrobial peptides from insects. In: Brey, P.T., Hultmark, D. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman & Hall, London, UK, pp. 40–66.
- Hoff, J., 2000. Methods of blood collection in the mouse. *Lab Animal* 29, 47–53.
- Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L.A., Wimmer, E.A., Jacobs-Lorena, M., 2002. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* 417, 452–455.
- Jaynes, J.M., Burton, C.A., Barr, S.B., Jeffers, G.W., Julian, G.R., White, K.L., Enright, F.M., Klei, T.R., Laine, R.A., 1988. In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. *FASEB Journal* 2, 2878–2883.
- Jensen, J.B., Trager, W., 1977. *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *Journal of Parasitology* 63, 883–886.
- Kaushal, D.C., Carter, R., 1984. Characterization of antigens on mosquito midgut stages of *Plasmodium gallinaceum*. II. Comparison of surface antigens of male and female gametes and zygotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 11, 145–156.
- Kim, W., Koo, H., Richman, A.M., Seeley, D., Vizioli, J., Klocko, A.D., O'Brochta, D.A., 2004. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. *Journal of Medical Entomology* 41, 447–455.
- Kokoza, V., Ahmed, A., Cho, W.L., Jasinskiene, N., James, A.A., Raikhel, A., 2000. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9144–9149.
- Lambros, C., Vanderberg, J.P., 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology* 65, 418–420.
- Moreira, L.A., Ito, J., Ghosh, A., Devenport, M., Zieler, H., Abraham, E.G., Crisanti, A., Nolan, T., Catteruccia, F., Jacobs-Lorena, M., 2002. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *Journal of Biological Chemistry* 277, 40839–40843.
- Oduola, A.M., Weatherly, N.F., Bowdre, J.H., Desjardins, R.E., 1988. *Plasmodium falciparum*: cloning by single-erythrocyte micromanipulation and heterogeneity in vitro. *Experimental Parasitology* 66, 86–95.
- Ponnudurai, T., Leeuwenberg, A.D., Meuwissen, J.H., 1981. Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to in vitro culture. *Tropical and Geographical Medicine* 33, 50–54.
- Possani, L.D., Zurita, M., Delepierre, M., Hernandez, F.H., Rodriguez, M.H., 1998. From noxiustoxin to Shiva-3, a peptide toxic to the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. *Toxicon* 36, 1683–1692.
- Powers, J.P., Hancock, R.E., 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24, 1681–1691.
- Riehle, M.A., Srinivasan, P., Moreira, C.K., Jacobs-Lorena, M., 2003. Towards genetic manipulation of wild mosquito populations to combat malaria: advances and challenges. *Journal of Experimental Biology* 206, 3809–3816.
- Rodriguez, M.C., Zamudio, F., Torres, J.A., Gonzalez-Ceron, L., Possani, L.D., Rodriguez, M.H., 1995. Effect of a cecropin-like synthetic peptide (Shiva-3) on the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. *Experimental Parasitology* 80, 596–604.
- Shahabuddin, M., Kaidoh, T., Aikawa, M., Kaslow, D.C., 1995. *Plasmodium gallinaceum*: mosquito peritrophic matrix and the parasite-vector compatibility. *Experimental Parasitology* 81, 386–393.
- Shahabuddin, M., Fields, I., Bulet, P., Hoffmann, J.A., Miller, L.H., 1998. *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. *Experimental Parasitology* 89, 103–112.
- Silva Jr., P.I., Daffre, S., Bulet, P., 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33464–33470.
- Sinden, R.E., Hartley, R.H., Winger, L., 1985. The development of *Plasmodium* ookinetes in vitro: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology* 91, 227–244.
- Templeton, T.J., Deitsch, K.W., 2005. Targeting malaria parasite proteins to the erythrocyte. *Trends in Parasitology* 21, 399–402.
- WHO, 2005. World malaria report 2005. World Health Organization, Geneva Switzerland. Available from: <http://www.rbm.who.int/wmr2005>.
- Zieler, H., Nawrocki, J.P., Shahabuddin, M., 1999. *Plasmodium gallinaceum* ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of *Aedes aegypti* by interaction with a carbohydrate ligand. *Journal Experimental Biology* 202, 485–495.
- Zieler, H., Keister, D.B., Dvorak, J.A., Ribeiro, J.M., 2001. A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *Journal of Experimental Biology* 204, 4157–4167.

#### **Artigo 4 – Manuscrito em preparação**

Expression of a mutated phospholipase A2 in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes  
towards *Plasmodium gallinaceum*

**Flávia Guimarães Rodrigues**, Thiago X. T. de Carvalho, Bruno Coelho Rocha, Michael Riehle, Paulo F. P. Pimenta, Marcelo Jacobs-Lorena, Cristiana F. Alves de Brito,  
Luciano Andrade Moreira

Running Title: Transgenic *Aedes fluviatilis*

Title: Expression of a mutated phospholipase A<sub>2</sub> in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes towards *Plasmodium gallinaceum*

Flávia G. Rodrigues<sup>1</sup>, Thiago X. T. de Carvalho<sup>1</sup>, Bruno C. Rocha<sup>1</sup>, Michael Riehle<sup>2</sup>, Paulo F. P. Pimenta<sup>3</sup>; Marcelo Jacobs-Lorena<sup>4</sup>; Cristiana F. Alves de Brito<sup>1</sup>, Luciano A. Moreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte-MG, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Entomology, University of Arizona, Tucson, AZ, USA.

<sup>3</sup> Laboratório de Entomologia Médica, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte-MG, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Molecular Microbiology and Immunology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Malaria Research Institute, Baltimore, MD, USA.

\*Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Malária, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte-MG, Brazil, CEP 30190-002. Phone: 55 31 3349 7772. Fax: 55 31 3295 3115. E-mail: luciano@cpqrr.fiocruz.br

**Abstract**

The genetic manipulation of mosquito vectors is an alternative strategy in the fight against malaria and it has been demonstrated that it is possible to generate transgenic mosquitoes expressing effector molecules that are able to block *Plasmodium* oocyst formation and sporozoite transmission to a vertebrate host. The bee venom phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) has been shown to inhibit ookinete invasion in the mosquito midgut and although very promising, when mosquito expressed this protein it significantly reduced mosquito egg production. In order to maintain the PLA<sub>2</sub> blocking ability without compromising mosquito fitness, we artificially mutated the protein coding sequence to inactivate the enzyme. The mutated PLA sequence was placed downstream of a mosquito midgut specific promoter (*Anopheles gambiae* peritrophin protein I promoter - AgPer1) and the construct used to transform *Aedes fluviatilis* mosquitoes on a transposon-mediated transformation through embryo microinjection. Four different mosquito transgenic lines were obtained and the presence of the transgene was characterized by PCR, RT-PCR and confocal microscopy. The transgenic mosquitoes' ability to block malaria parasite development was tested by comparing the parasite load in transformed and non-transformed mosquitoes. All four lines significantly inhibited *Plasmodium gallinaceum* oocyst development. The use of transgenic mosquitoes as a strategy to block parasite transmission is discussed.

**Key words:** Transgenic mosquito, mutated phospholipase A<sub>2</sub>, malaria, *Aedes*, *Plasmodium gallinaceum*, *piggyBac*

**Financial support:** TDR/WHO, CNPq, FAPEMIG.

## Introduction

Malaria remains a major global problem, causing an unacceptable toll on the health and economic welfare of the world's poorest communities. An estimated 350–500 million clinical malaria episodes occur annually; most of these are caused by infection with *P. falciparum* and *P. vivax*. Falciparum malaria causes more than 1 million deaths each year, mainly in sub-Saharan Africa. It also contributes indirectly on many additional deaths, mainly in young children, through synergy with other infections and illnesses (WHO, 2005).

Problems related to parasite drug resistance, mosquito resistance to insecticides and the lack of an effective vaccine bring the importance of seeking for alternative strategies in order to hamper malaria expansion. By genetic manipulating the mosquito vector it is possible to insert effector molecules that are able to block *Plasmodium* development within the insect (Ito *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). With that purpose, various candidates have been studied as the anti-circumsporozoite protein antibody (de Lara Capurro *et al.*, 2000); a dodecapeptide SM1 (Ghosh *et al.*, 2001); cecropin-like peptides (Arrighi *et al.*, 2002); gomesin (Moreira *et al.*, 2007); and the bee venom phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Zieler *et al.*, 2001).

Phospholipases A<sub>2</sub> enzymes belong to a protein family which catalyze the hydrolysis of the 2-acyl ester bond of glycerophospholipids, leading to the production of free fatty acids and lysophospholipids. Secreted phospholipases A<sub>2</sub> have been identified in venoms, but are also distributed in mammalian tissues, fluids, and secretions (Kudo and Murakami, 2002), plants (Lee *et al.*, 2003), bacteria (Sugiyama *et al.*, 2002) and viruses (Canaan *et al.*, 2004; Nagiec *et al.*, 2004). Venom PLA<sub>2</sub>s cause diverse pharmacological effects such as neurotoxic, myotoxic, cardiotoxic, or have anticoagulant properties, and some sPLA<sub>2</sub>s have been show to display antibacterial (Buckland and Wilton, 2000; Koduri *et al.*, 2002), antiviral (HIV) (Fenard *et al.*, 1999), or anti-*Plasmodium* activities (Deregnacourt and Scrével, 2000; Guillaume *et al.*, 2004).

PLA<sub>2</sub>s from snake, scorpion, or bee venoms are potent inhibitors of the *in vitro* intraerythrocytic development of *P. falciparum*, and its activity is more dependent on the presence of exogenous phospholipids in serum than the hydrolysis of erythrocyte membrane (Guillaume *et al.*, 2004; 2006). When administered via blood feeding venom PLA<sub>2</sub>s act towards the *P. falciparum* and *P. gallinaceum* sporogonic cycle by associating with the mosquito midgut epithelia and then blocking ookinete adhesion and invasion. This mechanism is independent of its catalytic activity (Zieler *et al.*, 2001).

Transgenic *Anopheles stephensi* mosquitoes expressing the bee venom PLA<sub>2</sub> were able to block both the development of *Plasmodium berghei* oocysts and transmission to naïve mice (Moreira *et al.*, 2002). Although very efficient, that effector protein reduced female fertility probably due to damage of midgut epithelial cells (Abraham *et al.*, 2005) causing reduction on uptake of blood nutrients and consequently reduction of egg production (Moreira *et al.*, 2004). Fitness of transgenic insects is a crucial feature when one envisages its use in nature.

Previous studies have shown the contribution of the histidine residue in the active site (position 48) of the pancreatic PLA<sub>2</sub>, in which the substitution of this

residue to asparagine does not affect the enzyme structural integrity, although reduces five fold its activity (Janssen *et al.*, 1999).

In order to maintain the *Plasmodium* blocking ability of the bee venom phospholipase A<sub>2</sub>, without causing any fitness related problem to mosquitoes we have made two point mutations causing amino acid changes on its coding region, and consequently inactivating the enzyme. Here, we expressed this new protein sequence in transgenic mosquitoes and tested the mutated PLA<sub>2</sub> (mPLA<sub>2</sub>) against *P. gallinaceum*.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Mosquitoes

*Aedes fluviatilis* were reared at 27°C and 80% humidity under a 12 h light/dark cycle, and adults were fed on 10% sucrose solution, *ad libitum*. For egg production female mosquitoes were blood fed in anesthetized Swiss Webster mice.

### 2.2. Mutated phospholipase A<sub>2</sub> (mPLA<sub>2</sub>) and construction

Point mutations on the original PLA<sub>2</sub> cDNA sequence (Moreira *et al.*, 2002) were obtained by PCR site directed mutagenesis. The histidine residue in the active site has been modified to asparagine and the alanine amino acid was modified to threonine in order to inactivate the bee venom phospholipase A<sub>2</sub> without altering its conformation (PLA<sub>2</sub>m).

The 5'UTR and 3'UTR sequences from *Anopheles gambiae* peritrophic matrix protein I (AgAper1) containing the promoter region, cloned in pUC19, were kindly provided by Dr. Abraham Eappen (Abraham *et al.*, 2005). The mutated bee venom PLA<sub>2</sub> replaced the original PLA<sub>2</sub> by restriction digesting the pUC19 (AgPer1/PLA<sub>2</sub>) plasmid with *Kpn* I and *Bam*H I. The mPLA<sub>2</sub> was inserted into *Kpn* I/*Bam*H I sites, between the 5 and 3 fragments of AgAper1, in pUC19. A *Pst* I site 610 bp downstream from the 5' end of the AgAper1 cloned promoter and pUC19 multiple cloning site *Pst* I were used to release the fragment carrying 2570 bp 5'-AgAper1 + 480 bp mPLA<sub>2</sub> sequence + 907 bp AgAper1 3' sequence. This *Pst* I/*Pst* I fragment was then transferred to the pSLfa1180fa shuttle vector that carries the unique *Fse* I and *Asc* I sites. The plasmid was digested with both enzymes and the fragment released was inserted into *Fse* I/*Asc* I sites of *piggyBac*[3×P3-EGFPpafm] to generate *piggyBac* [3×P3-EGFP(AgAper1PLA<sub>2</sub>m)]. The final plasmid has been sequenced before using for microinjection.

### 2.3. Microinjection and mosquito rearing

*Ae. fluviatilis* embryos were injected as previously described (Rodrigues *et al.*, 2006), with a mixture of *piggyBac*[3×P3-EGFP(AgPerPLA<sub>2</sub>m)] plasmid (0.3µg/µl) and *piggyBac* helper plasmid (0.2µg/µl), which encodes the transposase. Transformants were selected by screening the G1 larvae for the presence of GFP-positive individuals using a fluorescent stereomicroscope. Individually transformed adult mosquitoes were mated with non-transgenic mosquitoes to establish stable transgenic lines.

#### 2.4. Detection of the transgene

Larval DNA was isolated by an adapted protocol (Black & Munstermann, 1996). Briefly, 4<sup>th</sup> instar larvae from all transgenic lines and non-transgenic siblings were frozen in dry ice: ethanol bath, homogenized in grinding buffer (0.1M NaCl; 0.2M Sucrose; 0.1M Tris-HCl pH 9.1; 0.05M EDTA; SDS 0.05%) and incubated at 65°C for 30 min. Following proteinase K digestion for 3h at 52°C the DNA was extracted with phenol and phenol: chloroform: iso-amyl alcohol. After air drying, DNA pellet has been solubilized in 10 mM Tris-HCl, pH 8.5. For PCR analysis, primers specific to EGFP marker (EGFPF: 5'-GGTGCCCATCCTGGTCGAGC-3' and EGFP R: 5'-GCGGTCACGAACTCCAGCAGG-3'); mPLA<sub>2</sub> (mPLA<sub>2</sub>F: 5'GGTACCTGGCAAATCAGGGATAGG-3' and mPLA<sub>2</sub>R: 5'-GGATCCCTATCAGGCGTAGTCGG-3') and Actin (ActinF: 5'AAGGTGTGATGGTCGGTA-3' and ActinR: 5'-TCATTGCCCCACCAGAAC-3'; Krebs *et al.*, 2002) genes have been used.

#### 2.5. mPLA<sub>2</sub> RNA expression

Mosquito midguts were dissected from transgenic and wild type mosquitoes several time-points after a blood feeding. All tissues were immediately frozen in an ethanol/dry-ice bath and stored at -80°C. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. First-strand cDNA synthesis was performed with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with 0.5 µg total RNA from each sample as a template for the reactions and oligo-dT primer. To avoid genomic DNA carry over, total RNA has been treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega). After cDNA synthesis, oligonucleotides specific to the mPLA<sub>2</sub> fragment (AGPERF - 5' GTGTGGTGCTACTGTTGGC; PLAMR -5' GGATCCCTATCAGGCGTAGTCGG - 3') were used to mPLA<sub>2</sub> gene amplification in a PCR (95°C, 2min and 30 cycles of 95°C, 1min; 55° C 1min; 72° C 1min). As a control we used a ribosomal RNA specific gene (Gentile *et al.*, 2005) (RP49 F: 5'-GTGAAGAAGCGGACGAAGAAGTT-3' and RP49 R: 5'-TGCATCATCAGCACCTCCAGC-3') (95°C, 2min and 30 cycles of 95°C, 1min; 61° C 1min; 72° C 1min).

#### 2.6. Midgut immunostainings

Midguts from transgenic and non-transgenic mosquitoes fed on naïve mice were dissected in phosphate-buffered saline (PBS; 130 mM NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, pH 7.4) and fixed for 2h in 4% paraformaldehyde. Fixed tissues were washed with PBS three times for 5min and blocked in RPMI medium for 2h, at room temperature. In between each of these steps, midguts were washed twice for 5min in PBS. The anti-rabbit PLA<sub>2</sub> (Nordic) was diluted in blocking solution AC Dako (1:2000) (Dakocytomation) at 4°C overnight. Secondary antibody conjugated to Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene,OR) was used at 1:500 in Ac Dako for 2h incubation at room temperature. After each antibody incubation, the tissue was washed three times for 5min with PBT (1% bovine serum albumin, 0,2% Triton in PBS pH 7.5). The nuclei were counterstained with a 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (14mM) dilution of PBT for 10min. Immunostainings

were analysed by confocal microscope (LSM510,Zeiss) at magnifications of 200x and 400x, 505-550nm filter.

### 2.7. *Plasmodium gallinaceum* blocking experiments

*Plasmodium gallinaceum* strain 8A parasites were inoculated (via i.p.) in 2day-old chicks and parasitemia checked daily via Giemsa stained blood smears. Transgenic and non-transgenic mosquitoes (3-5 days old) maintained with sugar supplemented with 0.5g/L p-aminobenzoic acid (PABA) plus 0.025% gentamicine, were fed on chickens with 10-15% parasitemia with the presence of gametocytes. Fully engorged mosquitoes were separated after 24h and kept at 27°C with 10% sugar solution. On day 7, midguts were dissected and staining with mercurochrome (2% solution) and the number of oocysts per midgut was determined in a microscope (DIC-100x). The head has been separated from the thorax in order to screen, on a fluorescence stereoscope, which midguts belonged to each transgenic or non-transgenic mosquitoes. That procedure was done by another person in a double blinded method to avoid any interference with oocyst counting.

### 2.8. Statistical analysis

The blocking ability of transgenic mosquitoes expressing the mPLA<sub>2</sub> towards *P. gallinaceum* was analyzed with the non-parametric Mann-Whitney test, at 5% probability.

## 3. Results

By site directed mutagenesis it was possible to generate two point mutations in the bee venom phospholipase A<sub>2</sub> coding sequence, which implicated in amino acids changes and consequently inactivated the enzyme. This approach has been pursued because Zieler *et al.* (2001) have shown that even the inactive venom PLA<sub>2</sub>s are able to block *Plasmodium* spp.

We have used a mosquito midgut specific promoter (AgPer1) to drive the expression of the mPLA<sub>2</sub> in a transposon mediated strategy. By embryo microinjection we were able to generate and establish four independent mPLA<sub>2</sub>-expressing transgenic stable lines. Expression of the EGFP marker gene was detected by fluorescence microscopy by screening the G1 larvae and had the same pattern previously observed in other mosquito species (Kokoza *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004) (Figure 1).

By PCR, it was possible to amplify both marker (EGFP)(645 bp) and effector genes (mPLA<sub>2</sub>)(480 bp) only in transgenic lines and as a control, the *Aedes aegypti* Actin gene (Krebs *et al.*, 2002) has been used, which amplified a 882bp fragment (Figure 2).

In order to check whether the AgPer1 promoter could drive the expression of the mPLA<sub>2</sub> in mosquito midguts we performed RT-PCR in samples collected before (sugar fed midguts) and blood fed mosquito midguts (at 8 and 48 h post blood meal). Indeed, the peritrophin I protein promoter was able to drive the production of mPLA<sub>2</sub> specifically in mosquito midguts of all four transgenic lines. As already reported by Devenport *et al.* (2004) there was no modification on mRNA production

after a blood meal (Figure 4). In other mosquito tissues no mPLA<sub>2</sub> mRNA has been detected (data not shown), as expected.

The presence of mPLA<sub>2</sub> protein has been detected by immunostaining of mosquito midguts using a confocal microscope. As shown in Figure 5, the mutated PLA<sub>2</sub> was detected on epithelial cells of blood fed intact midguts using a commercial polyclonal anti bee venom PLA<sub>2</sub>. There is a diffuse pattern of protein localization throughout the entire organ. In non-transgenic mosquito midguts there was no protein signal, as expected. Specificity of the polyclonal antibody has been detected by Western blots using commercial bee venom PLA<sub>2</sub> and the protein was easily recognized by the commercial IgG (data not shown).

The effect of the mPLA<sub>2</sub> to the avian malaria parasite, *P. gallinaceum*, has been studied by feeding transgenic and non-transgenic female mosquito on the same infected chickens and by counting the number of *Plasmodium* oocysts in mosquito midguts seven days after infection. At least three independent experiments have been performed for each transgenic line. Although the inhibitions were not too high, there was a significant effect of the expression of the mPLA<sub>2</sub> towards malaria parasite development, when compared to non-transgenic siblings (Table 1). When infected mosquitoes were maintained for 15 days and had their salivary glands removed to check for the presence of sporozoites, transgenic mosquitoes had significantly less parasites than non-transgenic adult females (data not shown).

#### 4. Discussion

This is the first report on generation of transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes bearing a parasite blocking molecule. The purpose of expressing the inactive bee venom PLA<sub>2</sub> was based on our previous observations that transgenic *Anopheles stephensi* mosquitoes expressing the active enzyme had significantly reduced their egg production (Moreira *et al.*, 2004), probably due to midgut epithelia damage (Abraham *et al.*, 2005), which compromised nutrient absorption. That effect was not observed by Zieler *et al.* (2001) who firstly reported the *Plasmodium* blocking feature of venom PLA<sub>2</sub>s. When those authors chemically inactivated the enzyme, mixed with a parasite-enriched blood meal and fed female mosquitoes, no fitness related problems have been detected.

The idea of using midgut specific promoters to express potential parasite effector molecules has been pursued in different studies (Ito *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Abraham *et al.*, 2005). As the parasite early sporogonic stages develop within the mosquito midgut environment, the expression of a blocking molecule in that tissue could target gametocytes, gametes, zygotes and ookinetes (Baton & Ranford-Cartwright, 2005).

The AgPer1 protein is a peritrophic matrix major constituent, an acellular protection of the blood meal (Shen *et al.*, 1998). In anopheline mosquitoes, peritrophic matrix proteins are stored in vesicles within the mosquito midgut epithelial cells (Devenport *et al.*, 2004) and immediately released upon a blood meal. Differently, in culicine mosquitoes (*Aedes* spp.), epithelial cells store mRNA and whenever the mosquito ingests blood the protein is produced (Devenport *et al.*, 2006). Although we have used an anopheline promoter to express a transgene

in *Aedes*, which last shared a common ancestor at least 140 million years ago (Service, 1993), the *Anopheles* regulatory sequences have been recognized by *Ae. fluviatilis*. Previously, another mosquito gut specific promoter (*An. gambiae* carboxypeptidase) was also able to drive a transgene expression in *Ae. aegypti* (Moreira *et al.*, 2000).

The effect of phospholipases A<sub>2</sub> towards *Plasmodium* development has been extensively studied (Zieler *et al.*, 2001; Deregnacourt and Scrével, 2000; Guillaume *et al.*, 2004), although the exact mechanism of action is not completely understood. In culture, PLA<sub>2</sub>s have an indirect effect by degrading lipoproteins present in serum which, in turn produce toxic components to the parasite (Guillaume *et al.*, 2004).

Confocal microscopy was able to localize the transgenic protein in intact mosquito-fed midguts presenting a homogeneous distribution throughout the tissue and in one family showing a spotty pattern, which resembles vesicles. The latter pattern has been observed by Devenport *et al.* (2004) through immuno-electron microscopy, confirming the co-localization of Ag-AgPerl and Trypsin1 proteins.

Inhibition of oocyst development varied among different transgenic lines and even within lines, in different experiments. Those differences can be due to a indirordnt experim

model. *Parasitology*. 129 (6): 663-76, 2004.

Black, W.C., Munstermann L.E. Molecular taxonomy and systematics of arthropod vectors. *In: Beaty, B. J., Marquardt, W.C. The biology of disease vectors*. Ed. University Press of Colorado, Cap. 2, 438-70, 1996.

Buckland, A.G, Wilton, D.C. The antibacterial properties of secreted phospholipases A2. *Biochim. Biophys. Acta*, 1488: 71-82, 2000.

Canaan, S., Zadori, Z., Ghomashchi, F., Bollinger, J., Sadilek, M., Moreau, M.E, Tjissen, P., Gelb, M.H. Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* 279: 14502-8, 2004.

De Lara Capurro, M., Coleman, J., Beerntsen, B.T., Myles, K.M., Olson, K.E., Rocha, E., Krettli, A.U., James, A. A. Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62, 427-433, 2000.

Deregnacourt, C., Schrével J. Bee venom phospholipase A2 induces stage-specific growth arrest of the intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* via modifications of human serum components. *J. Biol. Chem.*, 275: 39973-80, 2000.

Devenport, M., Fujioka, H., Jacobs-Lorena, M. Storage and secretion of the peritrophic matrix protein Ag-Aper1 and trypsin in the midgut of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 13 (4): 349-58, 2004.

Devenport, M., Alvarenga, P.H., Shao, L., Fujioka, H., Bianconi, M.L., Oliveira, P.L., Jacobs-Lorena, M. Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUC1 as a heme-binding protein. *Biochemistry* 45 (31): 9540-9, 2006.

Fenard, D., Lambeau, G., Valentin, E., Lefebvre, J.C., Lazdunski, M., Doglio, A. Secreted phospholipase A(2), anew class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *J. Clin. Invest.*, 104: 611-8, 1999.

Gentile, C., Lima, J.B., Peixoto, A.A. Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100 (6): 545-47, 2005.

Ghosh, A.K., Ribolla, P.E., Jacobs-Lorena, M. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13278-81, 2001.

Guillaume, C., Deregnancourt, C., Clavey, V., Schrével, J. Anti-*Plasmodium* properties of group IA, IB, IIA, and III secreted phospholipases A2 are serum-dependent. *Toxicon*. 43: 311-8, 2004.

Guillaume, C., Calzada, C., Lagarde, M., Screvel, J., Deregnacourt, C. Interplay

between lipoproteins and bee venom phospholipase A2 in relation to their anti-*Plasmodium* toxicity. *J. Lipid Res.*, 47 (7): 1493-506, 2006.

Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L.A., Wimmer, E. A., Jacobs-Lorena, M. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, 417, 452-5, 2002.

Janseen, M.J.W, Van De Wiel, W.A., Beiboer, S.H., Van Kampen, M.D., Verheij, H.M., Slotboom, A.J., Egmond, M.R. Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A2 probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Eng.* 12: 497-503, 1999.

Kim, W, Koo, H, Richman, A.M, Seeley, D, Vizioli, J, Klocko, A.D, O'brochta, D.A. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): Effects on susceptibility to *Plasmodium*. *J. Med. Entomol.* 41(3): 447-55, 2004.

Koduri, R.S, Gronroos, J.O., Laine, V.J., Le Galvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T.J. Gelb, M.H. Bactericidal properties of human and murine group I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J. Biol. Chem.*, 277: 5849-57, 2002.

Kokoza, V., Ahmed, A., Wimmer, E.A., Raikhel, A.S. Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the piggyBac transposable element vector pBac[3xP3-EGFP afm]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31, 1137-43, 2001.

Krebs K.C., Brzoza K.L., Lan, Q. Use of subtracted libraries and macroarray to isolate developmentally specific genes from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32(12):1757-67, 2002.

Kudo I, Murakami, M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipids Mediat.* 68-69:3-58, 2002.

Lee, H.Y., Bahn, S.C., Kang, Y.M., Lee, K.H., Kim, H.J., Nohn, E.K., Palta, J.P., Shin, J.S., Ryu, S.B. Secretory low molecular weight phospholipase A2 plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:1990-2002, 2003.

Moreira, L.A, Edwards, M.J., Adhami, F., Jasinskiene, N., James, A.A., Jacobs-Lorena, M. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10895-8, 2000.

Moreira, L.A., Ito, J., Ghosh, A., Devenport, M., Zieler, H., Eappen G.A., Crisanti, A., Nolan, T., Catteruccia, F., Jacobs-Lorena, M. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J. Biol. Chem.*, 277, 40839-43, 2002.

Moreira, L.A, Wang, J., Collins, F. H., Jacobs-Lorena, M. Fitness of anopheline

mosquitoes expressing transgenes that inhibit *Plasmodium* development. *Genetics*, 166 (3): 1337-41, 2004.

Moreira, C.K., Rodrigues, F.G., Ghosh, A., Varotti, F.P., Miranda, A., Daffre, S., Jacobs-Lorena, M., Moreira, L.A. Broad effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium* spp. *Experimental Parasitology*, In press.

Nagiec, M.J., Lei, B., Parker, S.K., Vasil, M.I., Matsumoto, M., Ireland, R.M., Beres, S.B., Hoe, N.P., Musser, J.M. Analysis of a novel prophage-encoded group A Streptococcus extracellular phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 279, 45909-18, 2004.

Rodrigues, F.G., Oliveira, S.B., Rocha, B.C., Moreira, L.A. Germline transformation of *Aedes fluviatilis* (Diptera:Culicidae) with the *piggyBac* transposable element. *Mem. Inst. Oswaldo*, 101 (7): 755-7, 2006.

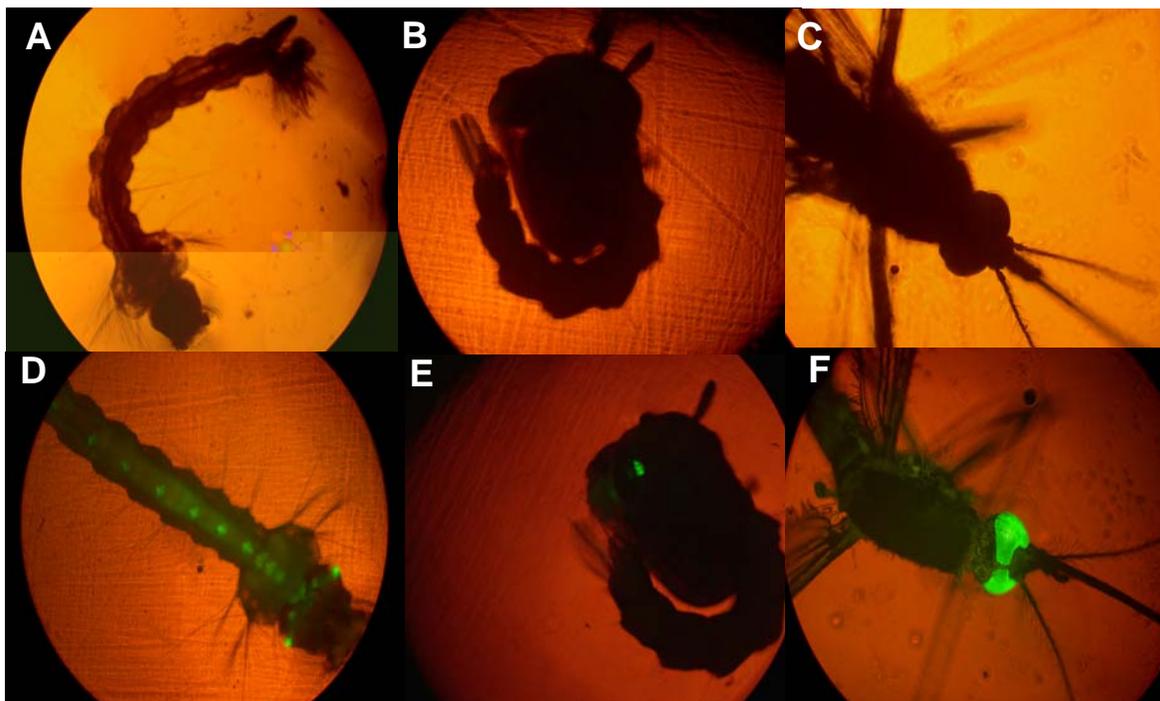
Service, M.W. Mosquitoes (Culicidae). In *Medical Insects and Arachnids*, eds. Lane, R. P. & Crosskey, R. W. (Chapman & Hall, London), pp. 120-240, 1993.

Shen, Z., Jacobs-Lorena, M. A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. *The Journal Biological Chemistry*, 273 (28): 17665-70, 1998.

Sugiyama, M.K., Ohtani, K., Izuhara, M., Koike, T., Susuki, K., Imamura, S., Misaki, H. A novel prokaryotic phospholipase A2. Characterization, gene cloning, and solution structure. *J. Biol. Chem.* 277: 20051-8, 2002.

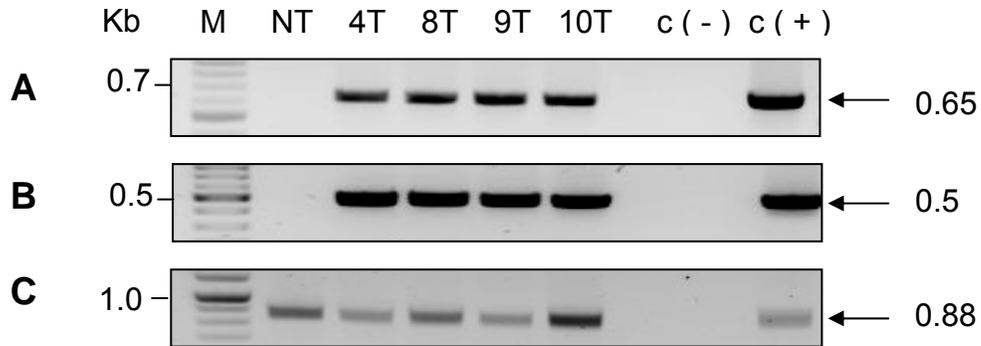
WHO. World Health Organization. World malaria report 2005. World Health Organization, Geneva Switzerland. [Online.] <http://www.rbm.who.int/wmr2005>, 2005.

Zieler, H., Keister, D.B., Dvorak, J.A., Ribeiro, J.M. A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *J. Exp. Biol.* 204 (23): 4157-67, 2001.



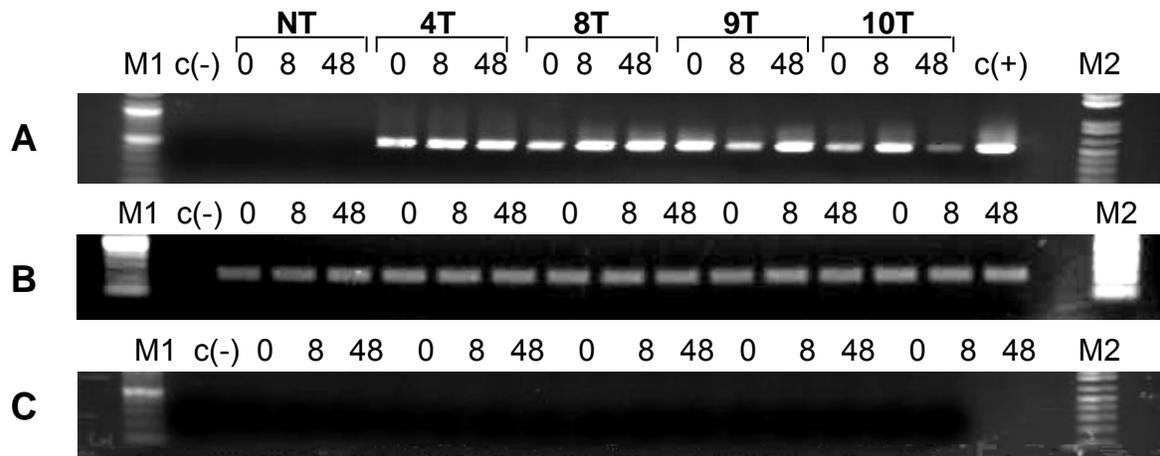
**Figure 1.**

**Green fluorescent protein expression pattern in different life stages of transgenic *Ae. fluviatilis* mosquitoes. A, B and C: non-transgenic larva, pupa and adult mosquito. D, E and F: transgenic larva, pupa and adult mosquito, respectively.**



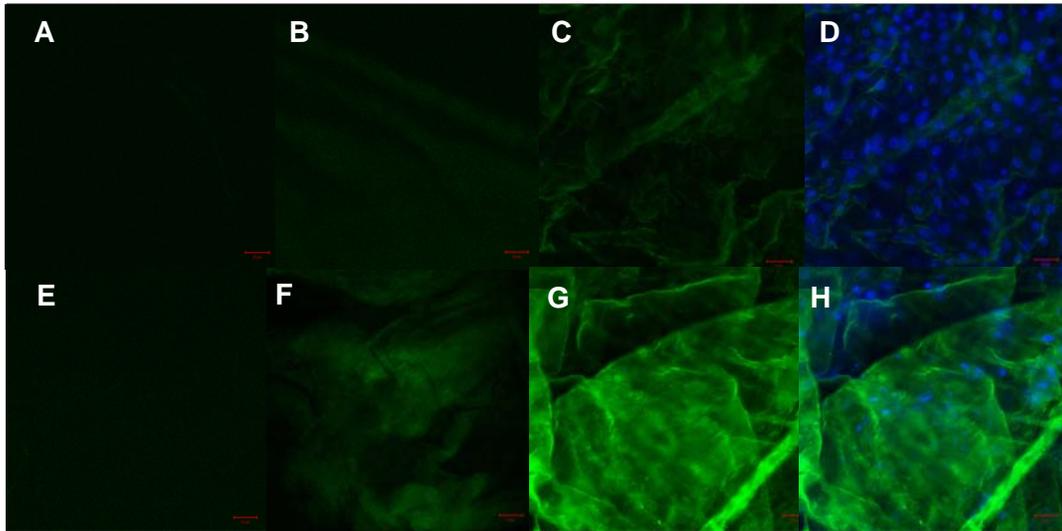
**Figure 2.**

**PCR amplification of the EGFP, m PLA<sub>2</sub> and Actin genes from genomic DNA isolated from non-transgenic and transgenic *Ae. fluviatilis* larvae:** Genomic DNA from non-transgenic (NT) and transgenic larvae from 4T, 8T, 9T, 10T lines were amplified by PCR with primers specific to each target gene (**A**: EGFP; **B**: m PLA<sub>2</sub>, **C**: Actin). **M**: 100 bp DNA marker; **c(-)**: no DNA; **4T, 8T, 9T, 10T**: transgenic lines; **NT**: non-transgenic; **c(+)**: *pBacEGFPAgPerPLA<sub>2</sub>m* (in **A** and **B**) and *Ae. aegypti* genomic DNA (**C**).



**Figure 3.**

**mPLA<sub>2</sub> mRNA expression in *Ae. fluviatilis* transgenic lines:** Total RNA samples isolated from non-transgenic and transgenic mosquito (4T, 8T, 9T and 10T) midguts (before and after a blood meal) were subjected to RT-PCR analysis using primers specific to the mPLA<sub>2</sub> gene (**A**), to the rRNA gene RP49 (ribosomal RNA) (**B**) or as a control, without the reverse transcriptase enzyme. **M1**: 100 bp DNA marker; **M2**: 1Kb plus DNA marker; **c(-)**: no cDNA; **NT**: non-transgenic; **4T**: transgenic line; **c1(+)**: pBacEGFP<sub>AgPerPLA<sub>2</sub>m</sub> (in **A**) and *Ae. fluviatilis* cDNA (in **B**).



**Figure 4.**

**Immunofluorescence staining of transgenic mosquitoes midgut by anti-PLA<sub>2</sub>:** (A) fixed midgut from non-transgenic mosquito, (B) incubated with secondary anti rabbit -IgG only, (C) treated with anti-rabbit PLA<sub>2</sub> and secondary antibody, (D) plus DAPI staining, (E) fixed midgut from 4T transgenic mosquito, (F) 4T midgut treated with secondary anti rabbit -IgG only, (G) 4T treated with anti-rabbit PLA<sub>2</sub> and secondary antibody, (H) plus DAPI staining (Scale bar = 20 μm).

Table 1: Effect of expression of mPLA<sub>2</sub> in transgenic *Aedes fluviatilis* towards *P. gallinaceum* oocyst formation

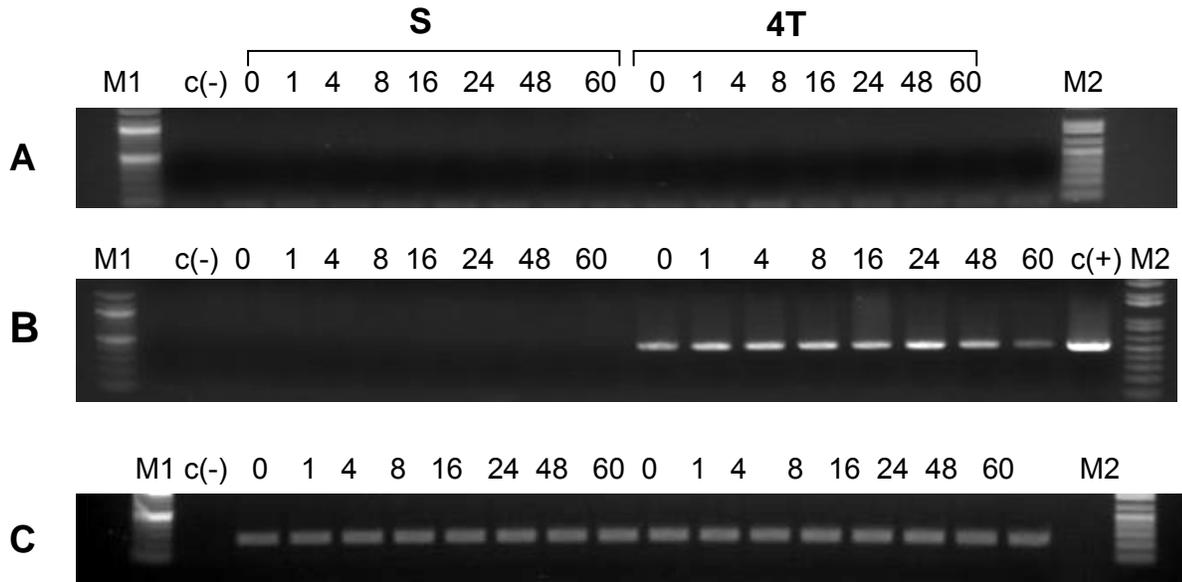
Experiment	Mosquitoes	Prevalence <sup>a</sup>	Oocyst <sup>b</sup>	Inhibition <sup>c</sup>
1	Control	96% (43/45)	51.9 (0-170)	-
	4T	86.2% (25/29)	26 (0-63)	<b>49.9%</b>
2	Control	96.4% (27/28)	41.9 (0-148)	-
	4T	75% (21/28)	13.4 (0-136)	<b>68%</b>
3	Control	90% (29/32)	83.6 (0-287)	-
	4T	86% (19/22)	40.1 (0-168)	<b>52%</b>
4	Control	87.5% (35/40)	104.75 (0-240)	-
	4T	71% (16/21)	65.6 (0-259)	<b>37.3%</b>
5	Control	80.6% (25/31)	26.4 (0-136)	-
	8T	75.6% (31/41)	19.4 (0-120)	<b>26.5%</b>
6	Control	74% (20/27)	12.7 (0-50)	-
	8T	59% (13/22)	4 (0-44)	<b>68.5%</b>
7	Control	85.2% (41/49)	48 (0-213)	-
	8T	75% (23/30)	34 (0-200)	<b>21.9%</b>
8	Control	83.3% (30/36)	34.8 (0-160)	-
	9T	71.4% (15/21)	20.5 (0-64)	<b>41.2%</b>
9	Control	100% (39/39)	49.8 (1-172)	-
	9T	80.9% (17/21)	41.2 (0-184)	<b>17.5%</b>
10	Control	78.3% (18/23)	11.9 (0-71)	-
	9T	65% (13/20)	8.6 (0-40)	<b>27.7%</b>
11	Control	87.5% (21/24)	7.5 (0-56)	-
	10T	81.8% (9/11)	3.8 (0-9)	<b>49.3</b>
12	Control	93% (38/40)	63.8 (0-212)	-
	10T	50% (10/20)	27.1 (0-124)	<b>57.5%</b>
13	Control	100% (32/32)	120.4 (12-291)	-
	10T	85.7% (19/21)	84.4 (0-198)	<b>30%</b>

<sup>a</sup> Percentage of infected (actual numbers in parenthesis).

<sup>b</sup> arithmetic mean of oocyst number per mosquito gut. The range of observed values is indicated in parenthesis.

<sup>c</sup>  $100 - [(mean\ oocyst\ number\ per\ gut\ in\ transgenic\ mosquitoes / mean\ oocyst\ number\ per\ gut\ in\ control\ mosquitoes) \times 100]$ . Reduction of oocyst number/gut was significant (P-value was < 0.05 for all lines) as calculated by the Mann-Whitney test.

## Supplementary material

**Figure S1.**

**mPLA<sub>2</sub> mRNA expression in *Ae. fluviatilis* transgenic lines:** Total RNA samples from non-transgenic and transgenic (4T) mosquito midguts were subjected to RT-PCR using oligonucleotides specific to the mPLA<sub>2</sub> gene (A) and to the rRNA gene RP49 (B). The amplicons were analyzed in ethidium bromide stained agarose gels (1%). **M1:** 100pb marker; **M2:** 1kb plus DNA marker; **c(-):** no DNA; **4T:** transgenic line; **S:** non-transgenic mosquito; **c(+):** pBacEGFPAgPerPLA<sub>2</sub>m.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham EG, Donnelly-Doman M, Fujioka H, Ghosh A, Moreira LA, Jacobs-Lorena M. (2005). Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with AgPer1 regulatory elements. *Insect. Mol. Biol.* 14: 271-9.
- Akaki M, Dvorak JA. (2005). A chemotactic response facilitates mosquito salivary gland infection by malaria sporozoites. *J. Exp. Biol.*, 208: 3211-18.
- Allen ML, O'Brochta DA, Atkinson PW, Levesque CS. (2001). Stable, germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 38 (5): 701-10.
- Amino R, Menard R, Frischknecht F. (2005). In vivo imaging of malaria parasites – recent advances and future directions. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 407-14.
- Amino R, Thiberge S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R. (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat. Med.*, 12 (2): 220-4.
- Anderson RJ, Hannan CM, Gilbert SC, Laidlaw SM, Sheu EG, Kortzen S, Sinden R, Butcher GA, Skinner MA, Hill AV. (2004). Enhanced CD8+ T cell immune responses and protection elicited against *Plasmodium berghei* malaria by prime boost immunization regimens using a novel attenuated fowlpox virus. *J. Immunol.*, 172 (5): 3094-100.
- Anon. (1991). Prospects for malaria control by genetic manipulation of its vectors (TDR/BCV/MAL-ENT/91.3), World Health Organization.
- Arrighi RB, Nakamura C, Miyake J, Hurd H, Burgess JG. (2002). Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malarias. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2104-10.
- Baldacci P, Menard R. (2004). The elusive malaria sporozoite in the mammalian host. *Mol. Microbiol.*, 54 (2): 298-306.
- Balu B, Shoue, DA, Fraser, MJ Jr, Adams, JH. (2005). High-efficiency transformation of *Plasmodium falciparum* by the lepidopteran transposable element piggyBac. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102 (45): 16391-6.
- Barillas-Mury CV, Noriega FG, Wells MA. (1995). Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 5(2):241-6.
- Barillas-Mury C, Kumar S. (2005). *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cell Microbiol.*, 7: 1539-45.
- Barr PJ, Green KM, Gibson HL, Bathurst IC, Quakyi IA, Kaslow DC. (1991). Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria

- transmission-blocking immunity in experimental animals. *J. Exp. Med.* 174, 1203-1208.
- Baton LA, Ranford-Cartwright LC. (2004). *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles atephehsi* is consistent with the Time Bomb model. *Parasitol.*, 129: 663-76.
- Berg OG, Gelb MH, Tsai MD, Jain MK. (2001). Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A2 paradigm. *Chem. Rev.*, 101: 2613-54.
- Berghammer AJ, Klingler M, Wimmer EA. (1999). A universal marker for transgenic insects. *Nature*, 402 (6760): 370-1.
- Billingsley PF, Rudin W. (1992). The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *J. Parasitol.*, 78 (3): 430-440.
- Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE, Morris HR. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, 392: 289-92.
- Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wening G, Franke-Fayard B, Brinkmann V. (2004). Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell*, 117: 503-14.
- Black WC, Munstermann LE. (1996). Molecular taxonomy and systematics of arthropod vectors. *In*: Beaty, B. J., Marquardt, W.C. The biology of disease vectors. Ed. University Press of Colorado, Cap. 26, 438-470.
- Blackman RK, Gelbart WM. (1989). The transposable element hobo of *Drosophila melanogaster*. *In*: Berg DE, Howe MM, (Eds.), Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington, DC, 523-5.
- Blackman RK, Macy M, Koehler D, Grimaila R, Gelbart WM. (1989). Identification of a fully functional hobo transposable element and its use for germ-line transformation of *Drosophila*. *EMBO J.*, 8: 211-7.
- Bladin S, Shiao SH, Moita LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC, Levashina EA. (2004). Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell*, 116: 661-70.
- Blanford S, Chan BH, Jenkins N, Sim D, Turner RJ, Read AF, Thomas MB. (2005). Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*, 308 (5728): 1638-1641.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Brennan JD, Kent M, Dhar R, Fujioka HA, Kumar N. (2000). *Anopheles gambiae* salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 13859-64.

- Buscaglia CA, Campo VA, Di Noia JM, Torrecilhas AC, De Marchi CR, Ferguson MA, Frasch AC, Almeida IC. (2004). The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. *J. Biol. Chem.* 279: 15860-15869.
- Callaerts P, Halder G, Gehring WJ. (1997). PAX-6 in development and evolution. *Annu. Rev. Neurosci.*, 20: 483-532.
- Carter R, Kaushal DC. (1984). Characterization of antigens on mosquito midgut stages of *Plasmodium gallinaceum*. III. Changes in zygote surface proteins during transformation to mature ookinete. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13, 235-241.
- Cary, LC, Goebel, M, Corsaro, BG, Wang, HG, Rosen, E, Fraser, MJ. (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology.* 172 (1): 156-69.
- Casu R, Eisemann C, Pearson RD, East I, Donaldson A, Cadogan L, Tellam RL. (1997). Antibody-mediated inhibition of the growth of larvae from an insect causing cutaneous myiasis in a mammalian host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:8939-8944.
- Catteruccia F, Nolan T, Blass C, Muller HM, Crisanti A, Kafatos FC, Loukeris TG. (2000a). Toward Anopheles transformation: *Minos* element activity in anopheline cells and embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 2157-62.
- Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A. (2000b). Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature*, 405: 959-62.
- Catteruccia F, Godfray HC, Crisanti A. (2003). Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Science*, 299 (5610): 1225-7.
- Catteruccia F, Benton JP, Crisanti A. (2005). An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. *Nat. Biotechnol.*, 23 (11): 1414-7.
- Charlwood JD. (1996). Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91: 391-8.
- Cheng L, Fu J, Tsukamoto A, Hawley RG. (1996). Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, 14: 606-9.
- Church GM, Gilbert W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 81(7):1991-5.
- Coates CJ, Jasinskiene N, Miyashiro L, James AA. (1998). Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3748-51.
- Coates CJ, Jasinskiene N, Pott GB, James AA. (1999). Promoter-directed expression

- of recombinant fire-fly luciferase in the salivary glands of Hermes-transformed *Aedes aegypti*. *Gene*, 226: 317-25.
- Collins FH, Sakai RK, Vernick KD, Paskewitz SM, Seeley DC. (1986). Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science* 234: 607-10.
- Collins WE, Jeffery GM. (2005). *Plasmodium ovale*: parasite and disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18 (3): 570-81.
- Conde R, Zamudio FZ, Rodriguez MH, Possani LD. (2000). Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* 471, 165-8.
- Consoli RAGB. (1976). Estudo sobre a biologia do *Aedes* (Finlaya) *fluviatilis* (Lutz, 1904) em laboratório. Tese de Mestrado, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 110 pp.
- Consoli RAGB, Willians P. (1978). Laboratory observations on the bionomics of *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae). *Bull. Ent. Res.*, 68: 123-136.
- Consoli RAGB, Willians P. (1981). Aspects of the biology of laboratory – reared female *Aedes fluviatilis*. *Mosq. News.*, 41: 30-6.
- Consoli RAGB, Lourenço-Oliveira R. (1998). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora FIOCRUZ, 228p.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173 (1): 33–8.
- Curtis CF. (1994). Should DDT continue to be recommended for malaria vector control? *Med. Vet. Entomol.*, 8: 107-12.
- Dagan A, Efron L, Gaidukov L, Mor A, Ginsburg H. (2002). In vitro antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1059-66.
- Daher VR, Krettli AU. (1980). Infectivity of *Plasmodium gallinaceum* sporozoites from oocysts. *J. Protozool.*, 27 (4): 440-2.
- Daniels SB, Chovnick A, Boussy IA. (1990). Distribution of hobo transposable elements in the genus *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, 7: 589-606.
- Deane LM. (1989). A Cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84 (Suppl.IV): 149-56.
- Deane LM, Causey OR, Deane MP. (1998). Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestinas e amazônica do Brasil. *Ver. Serv. Esp. Saúde Públ.* 1948 apud CONSOLI, R.A.G.B., OLIVEIRA, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora FIOCRUZ.

- Deepak G, Ghislaine MDC, Miller LH. (2004). Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int. J. Parasitol.*, 34: 1413-29.
- De Koning-Ward TF, Thomas AW, Waters AP, Janse CJ. (1998). Stable expression of green fluorescent protein in blood and mosquito stages of *Plasmodium berghei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 97: 247-52.
- De Lara Capurro M, Coleman J, Beerntsen BT, Myles KM, Olson KE, Rocha E, Krettli AU, James AA. (2000). Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 427-33.
- Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. (1979). Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16: 710-718.
- Devenport M, Fujioka H, Jacobs-Lorena M. (2004). Storage and secretion of the peritrophic matrix protein Ag-Aper1 and trypsin in the midgut of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 13 (4): 349-58.
- Devenport M, Fujioka H, Donnelly-Doman M, Shen Z, Jacobs-Lorena M. (2005). Storage and secretion of Ag-Aper14, a novel peritrophic matrix protein, and Ag-Muc1 from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Cell Tissue Res.*, 320 (1): 175-185.
- Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. (2005). Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 122 (3): 473-83.
- Drabek D, Zagoraiou L, Dewit T, Langeveld A, Roumpaki C, Mamalaki C, Savakis C, Grosveld F. (2003). Transposition of the *Drosophila hydei* Minos transposon in the mouse germ line. *Genomics*, 81: 108-11.
- East IJ, Fitzgerald H, Pearson RD, Donaldson RA, Vuocolo T, Cadogan LC, Tellam RL, Eisemann CH. (1993). *Lucilia cuprina*: inhibition of larval growth induced by immunization of host sheep with extracts of larval peritrophic membrane. *Int. J. Parasitol.*, 23: (2): 221-9.
- Edwards MJ, Lemos FJ, Donnelly-Doman M, Jacobs-Lorena M. (1997). Rapid induction by a blood meal of a carboxypeptidase gene in the gut of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27 (12): 1063-72.
- Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. (2000). Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *J. Insect Physiol.*, 46: 1313-20.
- Eisemann CH, Binnington KC. (1994). The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *Int. J. Parasitol.* 24 (1): 15-26.
- Elvin CM, Vuocolo T, Pearson RD, East IJ, Riding GA, Eisemann CH, Tellam R.

- (1996). Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-44, from the larvae of *Lucilia cuprina*. cDNA and deduced amino acid sequences. *J. Biol. Chem.*, 271, 8925-35.
- Eyles DE. (1951). Studies on *Plasmodium gallinaceum*. I – Characteristics of the mosquito *Aedes aegypti*. *Am. J. Hyg.*, 56: 101-12.
- Fazio MA, Oliveira Jr VX, Bulet P, Miranda MT, Daffre S, Miranda A. (2006). Structure-activity relationship studies of gomesin: importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities and serum stability. *Biopolymers*, 84: 3091-100.
- Feinberg AP, Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 132(1):6-13.
- Forattini OP. (1962). Entomologia Médica. 1º Volume. Parte Geral, Diptera, Anophelini. Faculdade de Higiene e Saúde Pública. Departamento de Parasitologia. São Paulo, 662p.
- Forattini OP. (1965). Entomologia Médica. 2º Volume. Parte Geral, Diptera, Anophelini. Faculdade de Higiene e Saúde Pública. Departamento de Parasitologia. São Paulo, p. 506.
- Franz G, Savakis C. (1991). Mimos, a new transposable from *Drosophila hydei*, is a member of the Tc-1-like family of transposons. *Nucl. Acids Res.*, 19: 6646.
- Fraser MJ, Ciszczon T, Elick T, Bauser C. (1996). Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect. Mol. Biol.* 5(2): 141-51.
- Frevert U, Usynin I, Baer K, Klotz C. (2006). Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cell. Microbiol.*, 8: 1537-46.
- Freyvogel TA, Jaquet C. (1965). The prerequisites for the formation of the peritrophic membrane in culicidae. *Acta. Trop.*, 22: 118-147.
- FUNASA – Fundação Nacional de Saúde (2001a). Distribuição da Malária no Brasil. Disponível em <http://funasa.gov.br>. Acesso em 20/06/2001.
- FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. (2001b). Controle biológico e manejo ambiental. Brasília (DF), p.65.
- Galvão ALA, Damasceno RG. (1944). Observações sobre anofelinos do complexo *albitarsis* (Díptera Culicidae). *Ann. Fac. Med.*, 20: 73-87.
- Gardiner DL, McCarthy, JS, Trenholme, KR. (2005). Malaria in the post-genomic era: light at the end of the tunnel or just another train? *Postgrad. Med. J.* (81): 505-509.
- Gardner MJ, Shallom SJ, Carlton JM, et al. (2002). Sequence of *Plasmodium*

- falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature* 419: 531-4.
- Garnham PCC. (1966). Malaria parasites and other haemosporidia. Blackwell Scientific Publications.
- Gentile C, Lima JB, Peixoto AA. (2005). Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100 (6): 545-547.
- Ghosh A, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. (2000). The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol. Today*, 16 (5): 196-201.
- Ghosh A, Srinivasan P, Abraham EG, Fujioka H, Jacobs-Lorena M. (2003). Molecular strategies to study *Plasmodium*-Mosquito interactions. *Trends Parasitol.* 19: 94-101.
- Grossman GL, Rafferty CS, Fraser MJ, Benedict MQ. (2000). The piggyBac element is capable of precise excision and transposition in cells and embryos of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 30: 909-14.
- Grossman GL, Rafferty CS, Clayton JR, Stevens TK, Mukabayire O, Benedict, MQ. (2001). Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with a piggyBac transposable element. *Insect. Mol. Biol.* 10: 597-604.
- Guerra CA, Snow RW, Hay SI. (2006). Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol.*, (8): 353-8.
- Guillaume C, Deregnaucourt C, Clavey V, Schevel J. (2004). Anti-*Plasmodium* properties of group IA, IB, IIA e III secreted phospholipases A2 are serum-dependent. *Toxicon*, 43: 311-318.
- Gupta L, Kumar S, Han YS, Pimenta PF, Barillas-Mury C. (2005). Midgut epithelial responses of different mosquito-*Plasmodium* combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 102: 4010-15.
- Gwadz RW, Kaslow D, Lee JY, Maloy WL, Zasloff M, Miller LH. (1989). Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Infect Immun.* 57 (9): 2628-33.
- Gwadz R, Collins FH. (1996). Anopheline mosquitoes and the agents they transmit. In: Beaty, B. J., Marquardt, W.C. The biology of disease vectors. Ed. University Press of Colorado, 73-84.
- Han YS, Thompson J, Kafatos FC, Barillas-Mury, C. (2000). Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *EMBO J*, 19: 6030-40.
- Handler AM, Mccombs SD, Fraser MJ, Saul SH. (1998). The lepidopteran transposon vector, piggyBac, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 95 (13): 7520-5.
- Handler AM, Harrell RA. (1999). Germline transformation of *Drosophila melanogaster*

- with the piggyBac transposon vector. *Insect Mol. Biol.*, 8: 449-57.
- Handler AM, McCombs SD. (2000). The piggyBac transposon mediates germ-line transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome. *Insect Mol. Biol.*, 9: 605-12.
- Handler AM. (2001). A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 111-28.
- Handler AM, Harrell RA. (2001a). Transformation of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a piggyBac vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31 (2): 199-205.
- Handler AM, Harrell RA. (2001b). Polyubiquitin-regulated DsRed marker for transgenic insects. *Biotechniques*, 31 (4): 820, 824-8.
- Hati AK. (1997). Urban malaria vector biology. *Indian J. Med. Res.*, 106: 149-163.
- Hediger M, Niessen M, Wimmer EA, Dubendorfer A, Bopp D (2001). Genetic transformation of the housefly *Musca domestica* with the lepidopteran derived transposon piggyBac. *Insect Molecular Biology*, 10 (2): 113-9.
- Heinrich JC, Li X, Henry RA, Haack N, Stringfellow L, Heath AC, Scott MJ. (2002). Germ-line transformation of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Insect Mol. Biol.*, 11 (1): 1-10.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A. et al. (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. 298 (5591): 129-49.
- Hörler E, Briegel H. (1995). Proteolytic enzymes of female *Anopheles*: biphasic synthesis, regulation, and multiple feeding. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 28, 189-205.
- Horn C, Jaunich B, Wimmer EA. (2000). Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev. Genes Evol.*, 210(12): 623-9.
- Horn C, Wimmer EA. (2000). A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev. Genes Evol.* 210: 630-7.
- Horn C, Schmid BG, Pogoda FS, Wimmer EA. (2002). Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 32 (10): 1221-35.
- Ibrahim GH, Smartt CT, Kiley LM, Christensen BM. (2000). Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30 (12): 1213-22.
- Ifediba T, Vanderberg JP. (1981). Complete in vitro maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Nature*, 294: 364-66.
- Ishino T, Yano K, Chinzal Y, Yuda M. (2004). Cell Passage Activity Is Required For The Malarial Parasite To Cross The Liver Sinusoidal Cell Layer. *Plos Biol.* 2, E4.

- Ishino T, Orito Y, Chinzei Y, Yuda M. (2006). A Calcium-Dependent Protein Kinase Regulates *Plasmodium* Ookinete Access To The Midgut Epithelial Cell. *Mol. Microbiol.*, 59: 1175-1184.
- Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M. (2002). Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, 417: 452-5.
- Jacobs-Lorena M, Oo MM. (1996) in *The Biology of Disease Vectors* (Beatty BJ, Marquardt WC, eds) pp. 318-332, University Press of Colorado, Colorado.
- Jacobson JW, Medhora MM, Hartl DL. (1986). Molecular structure of somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8684-8.
- Jaramillo M, Godbout M, Olivier M. (2004). Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and -independent mechanisms. *J. Immunol.*, 174 (1): 475-84.
- Jasinskiene N, Coates CJ, Benedict MQ, Cornel AJ, Rafferty CS, James AA, Collins FH. (1998). Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the housefly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3743-7.
- Jensen JB, Trager W. (1977). *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J. Parasitol.* 63: 883-6.
- Jiang Q, Hall M, Noriega FG, Wells M. (1997). cDNA cloning and pattern of expression of an adult, female-specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27: 283-9.
- Kadekoppala M, Kline K, Akompong T, Haldar K. (2000). Stable expression of a new Chimeric fluorescent reporter in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 68: 2328-32.
- Kaminski JM, Huber MR, Summers JB, Ward MB. (2002). Design of a nonviral vector for site-selective, efficient integration into the human genome. *FASEB J.*, 16 (10): 1242-7.
- Kato N, Dasgupta R, Smartt CT, Christensen BM. (2002). Glucosamine:fructose-6-phosphate aminotransferase: gene characterization, chitin biosynthesis and peritrophic matrix formation in *Aedes aegypti*. *Insect. Mol. Biol.*, 11(3): 207-16.
- Kaushal DC, Carter R. (1984). Characterization of antigens on mosquito midgut stages of *Plasmodium gallinaceum*. II. Comparison of surface antigens of male and female gametes and zygotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 11, 145-56.
- Kim W, Koo H, Richman AM, Seeley D, Vizioli J, Klocko AD, O'Brochta DA. (2004). Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. *J. Med. Entomol.* 41 (3): 447-55.

- Klinakis AG, Loukeris TG, Pavlopoulos A, Savakis C. (2000). Mobility assays confirm the broad host range activity of the *Minos* transposable element and validate new transformation tools. *Insect Mol. Biol.*, 9: 269-76.
- Knipling EF. (1959). Sterile-male method of population control. *Science*, 130: 902-4.
- Kokoza V, Ahmed A, Cho W-L, Jasinskiene N, James AA, Raikhel A. (2000). Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9144-9.
- Kokoza V, Ahmed A, Wimmer EA, Raikhel AS. (2001). Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the piggyBac transposable element vector pBac[3xP3-EGFP afm]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 1137-43.
- Kramer KJ, Muthukrishnan S. (1997). Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 27 (11): 887-900.
- Krebs A, Rothkegel M, Klar M, Jockusch BM. (2001). Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.*, 114 (20): 3663-72.
- Kreutzer RD, Kitzmiller JD, Rabbani MG. (1976). Cytogenetically distinguishable sympatric and allopatric populations of the mosquito *Anopheles albitarsis*. *Acta Amazom.*, 6: 473-81.
- Lambros C, Vanderberg JP. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.*, 65 (3): 418-420.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Lee YM, Zairi J. (2005). Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes aegypti*. *Trop. Biomed.*, 22 (1): 5-10.
- Lehane MJ, Billingsley PF. (1996). Biology of the insect midgut. I- Structure and ultrastructure of the insect midgut. Chapman & Hall.
- Lehane MJ. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 29-37.
- Levashina E. (2004). Immune responses in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 673-78.
- Lima JBP, Valle D, Peixoto AA. (2004). Analysis of reproductive isolation between sibling species *Anopheles albitarsis sensu stricto* and *Anopheles deaneorum*, two malaria vectors belonging to the Albitarsis Complex (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 41 (5): 888-92.

- Linthicum KJ. (1988). A revision of the Argyritasis section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Mosq. Sys.*, 20: 101-271.
- Lis JT, Simon JA, Sutton CA. (1983). New heat shock puffs and beta-galactosidase activity resulting from transformation of *Drosophila* with an hsp70-lacZ hybrid gene. *Cell*, 35: 403-10.
- Lobo N, Li X, Fraser MJ Jr. (1999). Transposition of the piggyBac element in embryos of *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* and *Trichoplusia ni*. *Mol. Gen. Genet.* 261 (4-5): 803-10.
- Lobo NF, Hua-Van A, Li X, Nolen BM, Fraser MJ Jr. (2002). Germ line transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, mediated by transpositional insertion of a piggyBac vector. *Insect Mol. Biol.*, 11 (2): 133-9.
- Loiola CCP, Mangabeira da Silva CJS, Tauil PL. (2002). Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am. J. Public Health*, 11 (4): 235-43.
- Lopez-Antunano FJ. (1992). Epidemiology and control of malaria and other arthropod-borne diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87 (3): 105-14.
- Lorenzini DM, Fukuzawa AH, Da Silva, PI Jr, Machado-Santelli G, Bijovsky AT, Daffre, S. (2003). Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 1011-6.
- Lu SJ, Pennington JE, Stonehouse AR, Mobula MM, Wells MA. (2006). Reevaluation of the role of early trypsin activity in the transcriptional activation of the late trypsin gene in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 36 (4): 336 – 343.
- Maragathavally KJ, Kaminski JM, Coates CJ. (2006). Chimeric Mos1 and piggyBac transposases result in site-directed integration. *FASEB J.*, 20 (11): 1880-2.
- Marrelli MT, Moreira CK, Kelly D, Alphey L, Jacobs-Lorena M. (2006). Mosquito transgenesis: what is the fitness cost? *Trends Parasitol.* 22 (5):197-202.
- Marrelli MT, Li C, Rasgon JL, Jacobs-Lorena M. (2007). Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on *Plasmodium*-infected blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (13): 5580-3.
- Mason JM, Konev AY, Biessmann H. (2003). Telomeric position effect in *Drosophila melanogaster* reflects a telomere length control mechanism. *Genetica*, 117 (2-3): 319-25.
- McCutchan T, Kissinger JC, Touray MG, Rogers MJ, Li J, Sullivan M, Braga EM, Krettli AU, Miller LH. (1996). Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarial parasites: Biological and phylogenetic implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11889-11894.

- McGrane V, Carlson JO, Miller BR, Beaty BJ. (1988). Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. *Am J Trop Med Hyg.*, 39 (5): 502-10.
- McGreevy PB, Dietze R, Prata A, Hembree SC. (1989). Effects of immigration on the prevalence of malaria in rural áreas of the Amazon Basin of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84 (4): 485-491.
- Meis JFGM, Ponnudurai T. (1989). Sexual and mosquito stages of *Plasmodium falciparum*. In *Intracellular Parasitism* (Moulder, J.W., ed.), 227-334.
- Meis JF, Wismans, PG, Jap PH, Lensen AH, Ponnudurai, T. (1992). A scanning electron microscopic study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. *Acta Trop.*, 50: 227-36.
- Miller LH, Sakai RK, Romans P, Gwadz RW, Kantoff P, Coon HG. (1987). Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 237 (4816): 779-81.
- Moreira LA, Edwards MJ, Adhami F, Jasinskiene N, James AA, Jacobs-Lorena M. (2000). Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10895–8.
- Moreira LA, Ito J, Ghosh A, Devenport M, Zieler H, Eappen GA, Crisanti A, Nolan T, Catteruccia F, Jacobs-Lorena, M. (2002). Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J. Biol. Chem.*, 277: 40839-43.
- Moreira LA, Wang J, Collins, FH, Jacobs-Lorena M. (2004). Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit *Plasmodium* development. *Genetics*, 166: 1337-41.
- Moreira CK, Rodrigues FG, Ghosh A, Varotti FP, Miranda A, Daffre S, Jacobs-Lorena, M, Moreira LA. (2007). Broad effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium* spp. *Experimental Parasitology*, In press.
- Morris AC, Eggleston P, Crampton JM. (1989). Genetic transformation of the mosquito *Aedes aegypti* by micro-injection of DNA. *Med. Vet. Entomol.* 3(1): 1-7.
- Moskalik LA, Oo MM, Jacobs-Lorena M. (1996). Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect. Mol. Biol.*, 5: 261-8.
- MS – Ministério da Saúde. (2006a). Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão.
- MS – Ministério da Saúde. (2006b). Malária. Disponível no site <http://portal.saude.gov.br/portal/svs>. Acesso em 10/01/2006.

- MS – Ministério da Saúde. (2007). Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (1): 263-73.
- Mural RJ, Adams MD, Myers EW. *et al.* (2002). A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science*, 296 (5573): 1661-71.
- Narang SK, Klein TA, Perera OP, Lima JP, Tang AT. (1993). Genetic evidence for the existence of cryptic species in the *Anopheles albitarsis* complex in Brazil: alloenzymes and mitochondrial DNA restriction fragment-length polymorphism. *Biochem. Genetic.*, 31: 97-112.
- National Research Council (1996). Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório. National Academic of Sciences.
- Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. (2005). Parasitologia Humana. 11ª edição Atheneu, 524p.
- Niles WJ, Fernando MA, Dissanaikie AS. (1965). *Mansonia crassipes* as the natural vector of filarioids, *Plasmodium gallinaceum* and other plasmodia of fowls in Ceylon. *Nature*, 205: 411-2.
- Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids. Res.* 18: 6169.
- Nolan T, Bower TM, Brown AE, Crisanti A, Catteruccia F. (2002). piggyBac-mediated germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi* using the red fluorescent protein dsRED as a selectable marker. *J. Biol. Chem.*, 277: 8759-62.
- Oaks SCJr, Mitchell VS, pearson gw, carpenter CCJ (1991). Malaria: Obstacles and opportunities. A report of the committee for the study on Malaria prevention and control: Status Review and Alternative Startegies Division of International Health, Institute of Medicine. National Academy Press, Washington, DC.
- O'Brochta DA, Atkinson PW, Lehane MJ. (2000). Transformation of *Stomoxys calcitrans* with a Hermes gene vector. *Insect Mol. Biol.*, 9 (5): 531-38.
- Osta MA, Christophides GK, Kafatos FC. (2004). Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science*, 303: 2030-32.
- Pascoa V, Oliveira PL, Dansa-Petretski M, Silva JR, Alvarenga PH, Jacobs-Lorena M, Lemos FJ. (2002). *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with

- heme during llood digestion. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 32 (5): 517 – 523.
- Passos AD, Fialho RR. (1998). Malaria: the epidemiological and control aspects. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31 (2): 93-105.
- Peloquin JJ, Thibault ST, Staten R, Miller TA. (2000). Germ-line transformation of pink bollworm (Lepidoptera: gelechiidae) mediated by the piggyBac transposable element. *Insect Mol. Biol.*, 9: 323-33.
- Perera OP, Harrell RA, Handler AM. (2002). Germ-line transformation of the South American malaria vector, *Anopheles albimanus*, with a piggyBac/EGFP transposon vector is routine and highly efficient. *Insect Mol. Biol.* 11 (4): 291-7.
- Perrone JB, Spielman A. (1988). Time and site of assembly of the peritrophic membrane of the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Tissue Res.*, 252 (2): 473-8.
- Peters W. (1992). Peritrophic membranes. In Zoophysiology (Bradshaw D, Burggren W, Heller HC, Ishii S, Langer H, Neuweiller G, Randall DJ, eds.), Vol. 130. Springer-Verlag, Berlin.
- Pimenta PF, Touray M, Miller L. (1994). The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 41 (6): 608-24.
- Pinkerton AC, Michel K, O'Brochta DA, Atkinson PW. (2000). Green fluorescent protein as a genetic marker in transgenic *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, 9: 1-10.
- Polley SD, Weedall GD, Thomas AW, Golightly LM, Conway DJ. (2005). Orthologous gene sequence of merozoite surface protein 1 (MSP1) from *Plasmodium reichenowi* and *P. gallinaceum* confirm an ancient divergence of *P. falciparum* alleles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 142: 25-31.
- Powers JP, Hancock RE. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24, 1681-91.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111 (2): 229-33.
- Riehle MA, Jacobs-Lorena M. (2005). Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 35 (7): 699-707.
- Riehle MA, Moreira CK, Lampe D, Lauzon C, Jacobs-Lorena M. (2007). Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut. *Int. J. Parasitol.*, In press.
- Rodrigues FG, Oliveira SB, Rocha BC, Moreira LA. (2006a). Germline transformation of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae) with the piggyBac transposable element. *Mem. Inst. Oswaldo*, 101 (7): 755-7.

- Rodrigues FG, Moreira LA. (2006b). Mosquitos transgênicos – possível arma contra a malária. *Ciência Hoje*, 39: 34-9.
- Rodriguez MH, Hernandez-Hernandez FL. (2004). Insect-malaria parasites interactions: The salivary gland. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 34: 615-24.
- Rosa-Freitas MG. (1989). *Anopheles (Nyssorhynchus) deaneorum*: a new species in the albitarsis complex (Díptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 535-43.
- Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva do Nascimento TF. (1998). Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93: 651-65.
- Rubin Gm, Spradling AC. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 218: 348-53.
- Rukachaisirikul V, Pramjit S, Pakawatchai C, Isaka M, Supothina S. (2004). 10-membered macrolides from the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris* BCC 2816. *J. Nat. Prod.* 67 (11): 1953-5.
- Scholte EJ, Ng'habi K, Kihonda J, Takken W, Paaijmans K, Abdulla S, Killeen GF, Knols BG.(2005). An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 308: 1638-41.
- Scholte EJ, Knols BG, Takken W. (2006). Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *J. Invertebr. Pathol.* 91 (1): 43-9.
- Service MW. (1993). Mosquitoes (Culicidae). In *Medical Insects and Arachnids*, eds. Lane, R. P. & Crosskey, R. W. (Chapman & Hall, London), pp. 120-240.
- Shahabuddin M, Lemos FJ, Kaslow DC, Jacobs-Lorena M. (1996). Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsin blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infect. Immun.* 64: 739-43.
- Shahabuddin M. (1998). *Plasmodium* ookinete development in the mosquito midgut: a case of reciprocal manipulation. *Parasitol.* 116: S83-S93.
- Shahabuddin M, Fields I, Bulet P, Hoffmann JA, Miller LH. (1998). *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. *Exp. Parasitol.* 89 (1): 103-12.
- Shahabuddin M, Pimenta PF. (1998). *Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (7): 3385-9.

- Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M. (2001). The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 47 (2): 119 – 125.
- Shao L, Devenport M, Fujioka H, Ghosh A, Jacobs-Lorena M. (2005). Identification and characterization of a novel peritrophic matrix protein, Ae-Aper50, and the microvillar membrane protein, AEG12, from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 947-59.
- Shen Z, Jacobs-Lorena M. (1998). A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. *The Journal Biological Chemistry*, 273 (28): 17665-70.
- Shen Z, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. (2000). A gut-specific serine protease from the malaria vector *Anopheles gambiae* is downregulated after blood ingestion. 9(3): 223-9.
- Sheng G, Thouvenot E, Schmucker D, Wilson DS, Desplan C. (1997). Direct regulation of rhodopsin 1 by Pax-6/eyeless in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes & Development*, 11 (9): 1122-31.
- Siden-Kiamos I, Ecker A, Nyback S, Louis C, Sinden RE, Billker O. (2006). *Plasmodium berghei* calcium-dependent protein kinase 3 is required for ookinete gliding motility and mosquito midgut invasion. *Mol. Microbiol.*, 60 (6): 1355-63.
- Silva PI Jr, Daffre S, Bulet P. (2000). Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J. Biol. Chem.* 275: 33464-70.
- Silveira AC, Rezende DF. (2001). Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil. Organização Pan Americana da Saúde, 120p.
- Sinden RE, Hartley RH, Winger L. (1985). The development of *Plasmodium* ookinetes in vitro: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology*, 91 (2): 227-44.
- Sinden RE, Alavi Y, Raine JD. (2004). Mosquito-malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34 (7): 625-9.
- Souza-Santos R. (2002). Distribuição sazonal de vetores da malária em Machadinho d'Oeste, Rondônia, Região Amazônica, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 18: 1813-8.
- Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-8.
- Steiner WWM, Narang S, Kitzmiller JB, Swofford DL. (1982). Genetic divergence and evolution in Neotropical *Anopheles* (*Nyssorhynchus*), pp. 523-550. In. Steiner

- WWM, Tabachnick WJ, Rai KS, Narang S. [eds.], Recent developments in the genetics of insect disease vectors. Stipes, Champaign IL.
- Strome CP, Beaudoin RL. (1974). The surface of the malaria parasite. I. Scanning electron microscopy of the oocyst. *Exp. Parasitol.*, 36: 131-42.
- Sturm A, Amino R, Van De San C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok J, Menard R, Heussler VT. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, 313: 1287-90.
- Tadei WP, Thatcher BD, Santos JMM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. (1998). Ecologic observations on Anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 325-35.
- Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P, Toshiki T, Chantal T, Corinne R, Toshio K, Eappen A, Mari K, Natuo K, Jean-Luc T, Bernard M, Gerard C, Paul S, Malcolm F, Jean-Claude P, Pierre C. (2000). Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyback transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* 18: 81-4.
- Tason de Camargo M, Krettli AU. (1978). *Aedes fluviatilis* (Lutz), a new experimental host for *Plasmodium gallinaceum* Brumpt. *J. Parasitol.*, 64: 924-5.
- Tellam RL. (1996). Protein motifs in filarial chitinases: An alternative view. *Parasitol. Today.*, 12 (7): 291-2.
- Templeton TJ, Kaslow DC. (1997). Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium gallinaceum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 84 (1): 13-24.
- Templeton TJ, Deitsch KW. (2005). Targeting malaria parasite proteins to the erythrocyte. *Trends Parasitol.* 21, 399-402.
- Terra WR, Ferreira C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B, 1-62.
- Terra WR. (1996). Evolution and function of insect peritrophic membrane. *Ciência e Cultura*, 48: 317-24.
- Thomas D, Donnelly CA, Wood RJ, Alpey LS. (2000). Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 287: 2474-76.
- Touré YT, Oduola AM, Morel CM. (2004). The *Anopheles gambiae* genome: next steps for malaria vector control. *Trends Parasitol.*, 20 (3): 142-9.
- Townbin H, Staehelin TE, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-3.

- Trigg PI, Kondrachine AV. (1998). Commentary: Malaria Control In The 1990s. *Bull World Health Organ.*, 76 (1): 11-6.
- Tsonis PA, Fuentes EJ. (2006). Focus on molecules: Pax-6, the eye master. *Exp. Eye Res.*, 83 (2): 233-4.
- Van Deenen LL, de Haas GH. (1964). The synthesis of phosphoglycerides and some biochemical applications. *Adv. Lipid. Res.* 2: 167-234
- Vanderberg JP, Frevert U. (2004). Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilization of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int. J. Parasitol.* 34: 991-6.
- Vizioli J, Catteruccia F, Della Torre A, Reckmann I, Muller HM. (2001). Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. *Eur. J. Biochem.*, 268 (14): 4027-35.
- Vlachou D, Zimmermann T, Cantera R, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC. (2004). Real time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cell Microbiol.*, 6: 671-85.
- Wang P, Granados RR. (1997). Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA. *J. Biol. Chem.*, 272: 16663-9.
- Wang P, Granados RR. (2001). Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 47: 110-8.
- Warburg A, Miller LH. (1992). Sporogonic development of a malaria parasite in vitro. *Science*, 255 (5043): 448-50.
- Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. (2004). Molecular biology of the gene. 5<sup>a</sup> Eds., Pearson Education, Copyright.
- Weber K, Osborn M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406- 12.
- WHO.- World Health Organization. 2005. World malaria report 2005. World Health Organization, Geneva Switzerland. [Online.] <http://www.rbm.who.int/wmr2005>.
- WHO.- World Health Organization (2006). Roll Back Malaria. Disponível no site: [www.rbm.who.int](http://www.rbm.who.int). Acesso em 12/12/2006.
- Wigglesworth VB. (1930). The formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. *Q. J. Microsc. Sci.*, 73: 593-616.
- Wilkerson RC, Parsons TJ, Klein TA, Gaffigan TV, Bergo E, Consolim J. (1995). Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera:

- Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. *J. Med. Entomol.* 32: 697-704.
- Yang TT, Cheng L, Kain SR. (1996). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids. Res.*, 24 (22): 4592–3.
- Yoshida S, Watanabe H. (2006). Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Mol. Biol.* 15 (4): 403-10.
- Zieler H, Keister DB, Dvorak JA, Ribeiro JM. (2001). A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *J. Exp. Biol.* 204: 4157-67.